

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de nuevas formulaciones tópicas de anfotericina B para el
tratamiento de micosis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carmen López Castillo

Directores

Juan José Torrado Durán

Manuel Córdoba Díaz

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA**



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de nuevas formulaciones tópicas de anfotericina B para
el tratamiento de micosis**

MEMORIA PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Carmen López Castillo

Directores

Dr. Juan José Torrado Durán
Dr. Manuel Córdoba Díaz

Madrid, 2015

Agradecimientos

Durante estos años son muchas las personas a las que he conocido y con las que he compartido buenos y malos momentos. Por eso quería empezar con un agradecimiento general a todas ellas, sin su apoyo este trabajo no hubiera sido igual y no habría sido capaz de llegar hasta aquí.

Quisiera expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, Dr. Juan José Torrado Durán y Dr. Manuel Córdoba Díaz, quienes me han aconsejado y orientado en este proyecto, me han apoyado y animado y finalmente me han transmitido sus valiosos conocimientos.

Asimismo, quisiera extender este agradecimiento a los profesores del Departamento de Tecnología Farmacéutica. En especial al Dr. Santiago Torrado Durán, quien me ha animado y aconsejado en los momentos difíciles de esta etapa.

No puedo olvidar a la Dra. Carmina Rodríguez Fernández perteneciente al Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, no sólo por su valiosa contribución en la parte experimental de la investigación sino por su desinteresada dedicación y sacrificio y su constante apoyo en todo momento.

A todos mis compañeros del departamento, con los que he compartido muchos buenos momentos que siempre recordaré. En especial a Helga, Loli, Claudia, Ioanna, Thuy y Esther, con las que he mantenido una relación más estrecha, y a Bea, por su dedicación y generosidad. Mención especial a Carlos, con el que a pesar de no poder compartir más en el laboratorio existe una complicidad total y siempre ha estado a mi lado en todo momento. Y como no, a mi gran amiga Lili, gracias por todo tu apoyo y cariño.

A mis grandes y fieles amigas que siempre han estado pendientes de mi evolución, dándome apoyo y cariño cuando más lo necesitaba. Ángeles, pamesanas, pijis y superpongas, gracias a cada una de vosotras por ser mis amigas y cuidarme tanto. No puedo olvidar a mi amigo Guille, por su incondicional apoyo y ayuda.

A mi gran y maravillosa familia, mis tíos, mis primos, mi cuñada y en especial a mis abuelas. Agradeceros el haber estado a mi lado en todo momento apoyándome constantemente y sacándome esa sonrisa que tanto os gusta ver cuando parecía que se había esfumado. Todos y cada uno de vosotros habéis puesto vuestro granito de arena para que este trabajo siguiera adelante. También quiero agradecer a mi nueva familia bolañega el cariño que me aporta cada vez que estoy junto a ellos pues me hacen sentir una más.

Finalmente nombrar a las personas que más quiero en este mundo y con las que estaré en deuda toda mi vida. Mis padres, por los que siento admiración y respeto, todo lo que tengo y lo que soy, es gracias a vosotros. Gracias por creer en mí y por apoyarme con los ojos vendados, por vuestros besos y abrazos, y por enseñarme que el amor y la familia son los dos pilares más fuertes que existen. Hermanito, agradecerte tu apoyo incondicional y tu cariño. Una vez creí que por ser la hermana mayor tendría que ser yo la profesora, pero hoy me doy cuenta de que el concepto de generosidad me lo has enseñado tú. Como dijo Aristóteles *“De todas las variedades de virtud, la generosidad es la más estimada”*. Gracias Manuel por dar sentido a esta frase. A mi Juan, mi marido, mi confidente, mi campeón. Gracias por estar a mi lado siempre, por hacer que mi vida sea mejor, porque el simple hecho de estar a mi lado me llena de alegría y me da fuerzas para seguir luchando. Tu paciencia y comprensión incondicional han sido mi apoyo, pero tu amor ha sido mi triunfo.

Sé que sin vosotros cuatro no hubiera podido llegar hasta aquí y alcanzar esta meta, por eso gracias, gracias y gracias.

A mi hermano Manuel.

Índice

AGRADECIMIENTOS.....	III
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
SUMMARY	11
1. INTRODUCCIÓN	19
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO.....	27
3. PARTE TEÓRICA: MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 MICOSIS SUPERFICIALES Y VÍA TÓPICA.....	33
3.1.1 Descripción general.....	33
3.1.2 Tratamiento antifúngico	59
3.1.3 La vía tópica como ruta de administración de fármacos: la piel.....	71
3.1.4 El estrato córneo y su función barrera.....	75
3.1.5 Rutas de penetración de xenobióticos a través de la piel.....	79
3.2 DISEÑO Y ELABORACIÓN DE FORMULACIONES TÓPICAS	83
3.2.1 Aspectos generales.....	83
3.2.2 Variantes de formulación de pomadas hidrófobas	93
3.2.3 Descripción general de los componentes utilizados en el presente estudio..	97
3.2.3.1 Principio activo: Anfotericina B	97
3.2.3.2 Orabase®	119
3.2.3.3 Dimetilsulfóxido	121
3.2.3.4. γ -Ciclodextrinas.	125
3.2.4 Elaboración de las formulaciones	133
3.3.1 Método de cuantificación de la anfotericina B.....	137
3.3.2 Caracterización reológica	143

3.3.2.1 Extensibilidad.....	143
3.3.3 Estudios de difusión <i>ex-vivo</i>	151
3.3.3.1 Planteamiento general de los estudios de difusión <i>ex-vivo</i>	151
3.3.3.1 Descripción de los estudios llevados a cabo en la presente memoria ...	169
3.3.4 Evaluación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i>	177
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	183
4. PARTE EXPERIMENTAL: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	187
4.1 POMADA BASE (AMB).....	189
4.1.1 Caracterización reológica.....	189
4.1.2 Estudios de difusión <i>ex-vivo</i>	195
4.1.3 Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	197
4.2 POMADA CICLODEXTRINAS (AMB-CD)	201
4.2.1 Caracterización reológica.....	201
4.2.1 Estudios de difusión <i>ex-vivo</i>	207
4.2.3 Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	209
4.3 POMADA DIMETILSULFÓXIDO (AMB-DMSO).....	213
4.3.1 Caracterización reológica.....	213
4.3.1 Estudios de difusión <i>ex-vivo</i>	219
4.3.3 Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	221
4.4 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS DATOS	223
4.4.1 Caracterización reológica.....	223
4.4.2 Estudios de difusión: absorción de anfotericina B a través de la piel.....	229
4.4.3 Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	233
5. CONCLUSIONES	243
6. BIBLIOGRAFÍA	247

Abreviaturas

AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AmA	Anfotericina A
AmB	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
AUC	Área bajo la curva
CCA	Concentración crítica de agregación
CI	Aclaramiento Total
CIR	Aclaramiento Renal
CMCC	Candidiasis Mucocutánea Crónica
CD	Ciclodextrina
c.s.p.	Cantidad Suficiente Para
ECVAM	Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidad Óptica
Dpto.	Departamento
GI	Gastrointestinal
HAR	Herencia autosómica recesiva
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IgE	Inmunoglobulina E
LC	Límite de Cuantificación

MHA	Agar Müeller-Hinton
PDMS	Polidimetilsiloxano
PM	Peso Molecular
RFE	Real Farmacopea Española
RPM	Revoluciones Por Minuto
Spp	Especie
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia humana
VO	Vía oral
YPD	Agar de extracto de levadura

RESUMEN

DESARROLLO DE NUEVAS FORMULACIONES TÓPICAS DE ANFOTERICINA B PARA EL TRATAMIENTO DE MICOSIS

Introducción y Objetivos

Las infecciones por hongos se han convertido en un tema de gran preocupación en todo el mundo, se estima que más de 40 millones de personas sufren infecciones por hongos, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (Güngör, *et al.*, 2013). Las micosis superficiales se encuentran entre las formas más frecuentes de infecciones en los humanos. Se estima que afectan un 20-25 % de la población mundial y su incidencia está constantemente en aumento (Vena, *et al.*, 2012) (Havlickova, *et al.*, 2008) (Das, *et al.*, 2007). Actualmente, este tipo de infecciones son un frecuente motivo de consulta para el médico de familia (Hernández, *et al.*, 2014) y el dermatólogo. Lo cual nos obliga a permanecer constantemente actualizados

La candidiasis es la micosis emergente con mayor efecto en el ser humano debido a su frecuencia y a la gravedad de sus complicaciones (López-Martínez, R., 2010). La candidiasis superficial es una de las formas clínicas más comunes. Es característicamente crónica y recurrente, y, a veces, indica el comienzo de las formas graves de esta micosis (Pappas, *et al.*, 2009). Las levaduras del género *Candida* son microorganismos pertenecientes a la microbiota normal de individuos sanos, principalmente en la mucosa oral, el tracto gastrointestinal y el tracto genitourinario femenino (Shao, *et al.*, 2007). Sin embargo, estos hongos son responsables de diferentes manifestaciones clínicas, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, que van desde infecciones de la piel y mucosas a infecciones sistémicas (Sardi, *et al.*, 2013). Su importancia viene de la alta frecuencia con que colonizan e infectan el huésped humano (De Bernardis, *et al.*, 2004), siendo el cuarto patógeno más común asociado con los casos de infección nosocomial (Wisplinghoff, *et al.*, 2004).

Actualmente, los antimicóticos o antifúngicos se pueden clasificar en dos categorías que corresponden a las clases de micosis, es decir, los que poseen actividad sistémica y los de aplicación local. Los productos antifúngicos tópicos representan un 16 % del total de productos dermatológicos, con un crecimiento por encima del 4 % anual y un 65 % del consumo total de antifúngicos (Alou, *et al.*, 2001). Las cremas y las formulaciones en gel y/o solución son las más usadas y, además, presentan un mayor

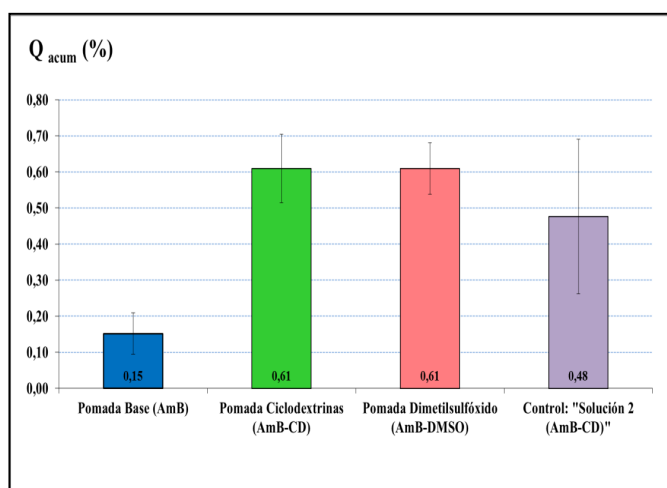
incremento del consumo, dado que cada día son terapéuticamente más eficaces y presentan pocos efectos secundarios (Crespo, *et al.*, 2005). Los tratamientos convencionales de infecciones fúngicas se basan actualmente en unos pocos agentes tales como azoles y polienos (nistatina), que tienen serios problemas relacionados con la eficacia, espectro de actividad, toxicidad, baja potencia y farmacocinética inadecuadas (Scott, *et al.*, 2012). Por otra parte, la aparición de resistencia microbiana a los agentes antimicrobianos muestra un problema creciente de la salud pública en todo el mundo y el mayor obstáculo para el éxito de un tratamiento (Oliveira, *et al.*, 2008) (Benghezal, *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta la necesidad de medicamentos más efectivos y que presenten menos resistencias en la terapia antifúngica a nivel mucocutáneo, el objetivo primordial del presente trabajo consiste en el desarrollo y optimización de una fórmula de uso tópico con anfotericina B (por ser uno de los antifúngicos de más amplio espectro, así como de más bajo índice de aparición de resistencias (Manzano, *et al.*, 2008)) en forma de pomada, para el tratamiento local de infecciones fúngicas a nivel superficial. Para la consecución de este objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos que conforman el planteamiento del trabajo de investigación:

1. Diseño de formulaciones semisólidas de AmB en forma de pomada. Para ello se selecciona el excipiente Orabase® como base de la formulación y se estudia la incorporación de distintos promotores de penetración cutánea a diferentes proporciones, para seleccionar la opción más adecuada.
2. Preparación de AmB encapsulada en ciclodextrinas mediante procedimientos de co-precipitación por liofilización, desarrolladas en estudios previos (Ruiz, 2010). Incorporación del complejo encapsulado en una formulación semisólida con la misma base que la utilizada en el punto anterior.
3. Caracterización farmacotécnica de las formulaciones obtenidas (AmB en Orabase®, AmB en Orabase® con ciclodextrinas, y AmB en Orabase® con promotor seleccionado), incluyendo análisis de la dosis de AmB mediante HPLC, y caracterización reológica: extensibilidad, viscosidad, tixotropía, etc.
4. Estudios de difusión *ex-vivo* utilizando piel dorsal de ratón sin pelo (Hairless-Mouse SKH1-HrBR-Charles River) con las tres fórmulas desarrolladas. Análisis comparativo de la capacidad de penetración de la AmB en celdas de difusión de flujo continuo.

5. Experimentos de eficacia microbiológica *in vitro* con diferentes cepas de los géneros *Candida* y *Saccharomyces*.
6. Análisis comparativo de datos y selección final de formulaciones.

Resultados

La formulación con menos consistencia (la que contiene el excipiente líquido DMSO) es la que tiene mayor extensibilidad y menor viscosidad. El comportamiento opuesto es el que se observa en la formulación con CD; probablemente el carácter aglutinante de este excipiente es el responsable de su mayor consistencia y viscosidad y menor extensibilidad. Las tres formulaciones presentan una baja tixotropía.



Los porcentajes medios acumulados de AmB en los ensayos de difusión con piel de ratón sin pelo con la Pomada CD y la Pomada DMSO fueron superiores a los de la Pomada Base. Podemos confirmar que las CD tienen un efecto promotor de penetración similar al del DMSO.

Ilustración 1. Porcentajes de AmB acumulados en la membrana a partir de cada formulación.

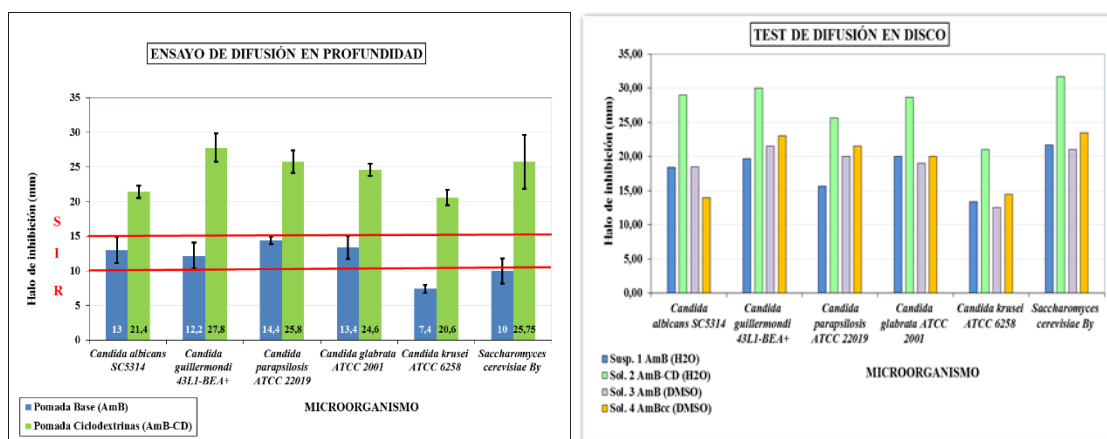


Ilustración 2. Promedio de las medidas de los halos de inhibición de las distintas formulaciones.

Las formulaciones con CD presentan mayor actividad antifúngica (posible aumento del efecto antifúngico de la AmB). *C. krusei* ATCC 6258 es la cepa que presenta menor sensibilidad frente a la AmB en todos los casos.

Conclusiones

1. Se han preparado en frío diferentes pomadas hidrófobas con AmB utilizando como excipiente Orabase®. Se estudia el efecto de disolución de la AmB empleando como vehículos agua, DMSO y complejos con γ -CD. Las formulaciones del presente trabajo han sido caracterizadas desde un punto de vista organoléptico sin cambios aparentemente significativos entre ellas, presentando un color amarillento, sin olor y una textura granulosa característica del propio Orabase®.

2. Las formulaciones estudiadas han sido caracterizadas desde un punto de vista reológico, incluyendo las propiedades de extensibilidad, viscosidad, consistencia y tixotropía. Cuando se utiliza un vehículo líquido (DMSO) en la pomada, se obtiene menor consistencia y viscosidad y mayor extensibilidad. El efecto contrario se observa al utilizar γ -CD como vehículo debido a su acción aglutinante.

3. Las tres formulaciones ensayadas presentan un comportamiento pseudoplástico con un índice de comportamiento de flujo menor a uno. Todas las pomadas estudiadas presentan una baja tixotropía aunque la pomada con DMSO presenta una mayor dificultad en la recuperación de su estructura.

4. Los resultados obtenidos con los ensayos de difusión nos han permitido detectar una acumulación de principio activo en la piel de ratón sin pelo durante 24 horas, por parte de todas las formulaciones estudiadas (pomadas y solución control). La Pomada Base (AmB) es la que presenta menor acumulación de AmB en la piel. Los porcentajes medios acumulados en los ensayos con las formulaciones con CD (Pomada y Solución Control) y DMSO fueron superiores al de la Pomada Base (AmB). La γ -CD en estas formulaciones tienen un efecto promotor de penetración similar al del DMSO a igual concentración.

5. Los resultados obtenidos del contenido de AmB acumulado después de 24 horas de ensayo en el compartimento receptor a través de la piel de ratón sin pelo

demuestran que en ningún caso se detectó la presencia de AmB. Por esta razón se puede concluir que las formulaciones con γ -CD y DMSO son eficaces para vectorizar el principio activo en la piel y evitar efectos secundarios por absorción sistémica por lo que son prometedoras para el tratamiento de infecciones fúngicas locales en la piel.

6. En cuanto a los ensayos de eficacia microbiológica la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) presenta siempre una acción antifúngica entre 45-60 % más activa que la Pomada Base (AmB) dependiendo de la cepa, siendo activa frente a todas las levaduras ensayadas. Se demuestra que las γ -CD potencian el efecto antifúngico de la AmB, aumentando su actividad.

7. En función de todos los resultados obtenidos, seleccionamos a la **Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD)** como la formulación eficaz y segura siendo el candidato más adecuado para continuar con otros estudios.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF NEW TOPICAL FORMULATIONS OF AMPHOTERICIN B FOR MYCOSIS TREATMENT

Fungal infections have become an issue of great concern around the world; it is estimated that over 40 million people do in fact suffer fungal infections both in developed and in developing countries (Güngör, *et al.*, 2013). Superficial fungal infections are among the most common forms of infection in humans. They are believed to affect 20 to 25 % of the world's population, and the incidence continues to increase (Vena, *et al.*, 2012) (Havlickova, *et al.*, 2008) (Das, *et al.*, 2007). Currently, these infections are a frequent cause for consulting a family doctor (Hernández, *et al.*, 2014) and the dermatologist. Therefore, we must stay regularly updated.

Candidosis is the emerging mycosis that has the greatest effect in humans due to its frequency and the severity of its complications (López-Martínez, R., 2010). Superficial candidosis is one of the most common clinical forms. It is characteristically chronic and recurrent, and at times, it indicates the beginning of severe forms of this micosis (Pappas, *et al.*, 2009). Candida yeasts are microorganisms belonging to the normal microbiota of healthy individuals, mainly in the oral mucosa, the gastrointestinal tract and the female genitourinary tract (Shao, *et al.*, 2007). However, these fungi are responsible for different clinical manifestations, especially in immunocompromised patients, ranging from skin and mucous infections to systemic infections (Sardi, *et al.*, 2013). Its importance lies in the high frequency with which colonize and infect the human host (De Bernardis, *et al.*, 2004), becoming the fourth most commonly associated pathogen with nosocomial infection (Wisplinghoff, *et al.*, 2004).

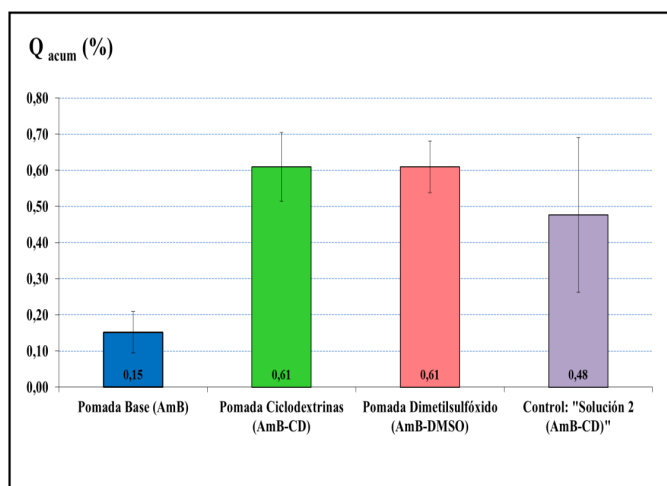
Currently, antifungal can be classified into two categories that correspond to kinds of mycosis, those having systemic activity and local application. Topical antifungal products represent 16 % of dermatological products, with annual growth above 4 % and 65 % of total consumption of antifungals (Alou, *et al.*, 2001). Creams and gel formulations and / or solutions are the most used and also show a higher increase in consumption, because each day are therapeutically more effective and have fewer side effects (Crespo, *et al.*, 2005). Conventional treatments of fungal diseases are currently based on a few chemotherapeutic agents such as azoles and polyenes (nystatin), which have serious problems related to effectiveness, activity spectrum, toxicity, low power and inadequate pharmacokinetics (Scott, *et al.*, 2012). Moreover,

the occurrence of microbial resistance to antimicrobial agents is shown to be a growing public health problem worldwide and the biggest obstacle to the success of a treatment (Oliveira, *et al.*, 2008) (Benghezal, *et al.*, 2007). Given the need for more effective drugs and with less resistance to antifungal therapy in mucocutaneous level, the primary objective of this work focuses on the development and optimization of a topical formulation with amphotericin B (being one of the antifungal with wider spectrum and lower rate of emergence of resistance (Manzano, *et al.*, 2008)) as an ointment, for local treatment of fungal infections superficially. In order to achieve this main objective, the following specific objectives which represent the proposal of this research work are proposed:

1. Design of semi-solid formulations of AmB in ointment form. Orabase® excipient is selected as the base of the formulation and the incorporation of different skin penetration promoters at different proportions in order to select the most suitable option is studied.
2. Preparation of AmB encapsulated in cyclodextrins using procedures of coprecipitation by lyophilization, which have been developed in previous studies (Ruiz, 2010). Incorporation of the encapsulated complex in a semi-solid formulation with the same base used in the previous point.
3. Pharmacotechnical characterization of the formulations obtained (AmB in Orabase®, AmB in Orabase® with cyclodextrins and AmB in Orabase® with selected promoter), including the analysis of AmB dose by HPLC and rheological characterization: extensibility, viscosity, thixotropy, etc.
4. *Ex vivo* diffusion studies using dorsal skin of hairless mouse (Hairless-Mouse SKH1-HrBR -Charles River) with the three developed formulations. Comparative analysis of the ability of penetration of the AmB in continuous flow diffusion cells.
5. *In vitro* microbiological efficacy experiments with different strains of *Candida spp.* and *Saccharomyces*.
6. Comparative data analysis and final selection of formulations.

Results

The formulation with less consistency (which contains the liquid excipient DMSO) is the one with greater extensibility and lower viscosity. The opposite behaviour is observed in the formulation with CD; the binding character of this excipient is likely to be responsible for the greater consistency and lower viscosity and extensibility. The three formulations show low thixotropy.



The average percentages of accumulated AmB in the diffusion trials with hairless mouse skin with CD Ointment and DMSO Ointment were higher than those with Ointment Base. We can confirm that CD has similar penetration promoter effect than DMSO.

Illustration 3. The average percentages of accumulated AmB from each formulation.

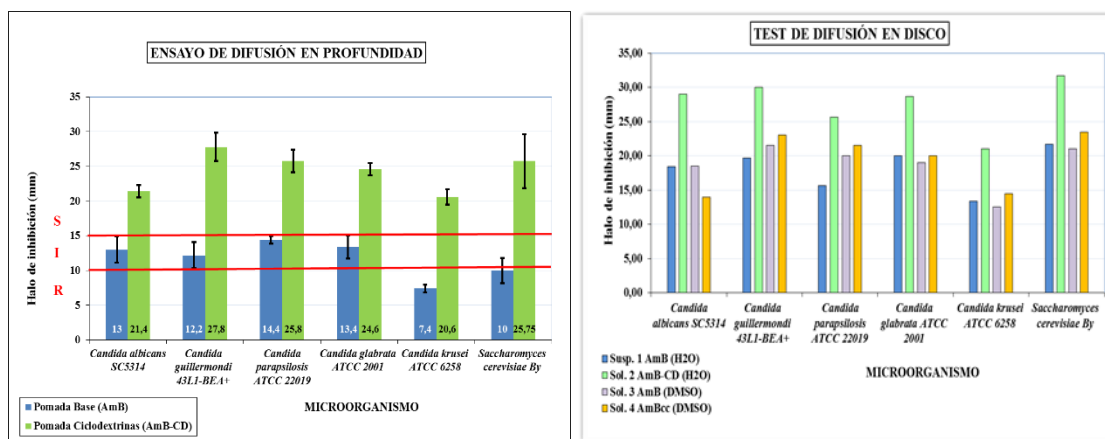


Illustration 4. Average measurements of the inhibition halo of the different formulations.

Formulations with CD have higher antifungal activity (potential synergistic effect of AmB) *C. krusei* ATCC 6258 is the strain which shows less sensitivity to AmB in all cases.

Conclusions

1. Different hydrophobic ointments of AmB have been prepared in cold conditions using Orabase® as excipient. The effect of dissolution of the AmB using water, DMSO and γ -CD complexes as vehicles is studied. The formulations of the present study have been organoleptically characterized without apparently significant changes between them, showing a yellowish colour, odourless and a grainy characteristic texture of Orabase®.

2. The studied formulations have been characterized from a rheological point of view, including extensibility properties, viscosity, consistency and thixotropy. When a liquid carrier (DMSO) is used in the ointment, lower consistency and viscosity and greater extensibility is obtained. The opposite effect is observed when using γ -CD as a vehicle due to its binding action.

3. The three tested formulations show pseudoplastic behaviour with an index of flow behaviour below one. All studied ointments have low thixotropy although DMSO Ointment presents a major difficulty in the recovery of its structure.

4. The results obtained with diffusion trials allowed us to detect an accumulation of active substance in the hairless mouse skin for 24 hours, in all the formulations studied (Ointments and Control Solution). Ointment Base (AMB) is the one with less accumulation of AmB in skin. The average percentages accumulated in trials with the formulations with CD (Ointment and Control Solution) and DMSO were higher than those with an Ointment Base (AMB). In these formulations γ -CD has similar penetration promoter effect than DMSO at the same concentration.

5. The results of the accumulated content of AmB after 24 hours of testing in the receptor compartment through hairless mouse skin show that in any case the presence of AmB was detected. Therefore it can be concluded that the formulations with γ -CD and DMSO are effective to trace the active substance in the skin and to prevent the side effects of systemic absorption, so that they are promising formulations for the treatment of local fungal skin infections.

6. According to microbiological efficacy trials, CD ointment (AmB-CD) shows in all cases antifungal effect, 45-60 % more active than ointment Base (AmB) depending

on the strain, resulting effective in all yeasts studied. γ -CD strengthen the antifungal effect of AmB, increasing its activity.

7. According to all results, ciclodextrines ointment (AmB-CD) is selected as the most effective and secure formulation, becoming the most suitable candidate for further studies.

1. INTRODUCCIÓN

Entre todos los grupos de organismos que pueblan la superficie de la tierra, son los hongos los que tienen mayor poder de adaptación, y que, a lo largo de la historia de la humanidad han traído grandes beneficios, pero también han provocado grandes perjuicios cuando infectan al hombre siendo capaces de enfermarlo. El término que aglutina a las infecciones fúngicas en el ser humano, en general, se denomina micosis (Foster, *et al.*, 2004).

Las infecciones por hongos se han convertido en un tema de gran preocupación en todo el mundo, se estima que más de 40 millones de personas sufren infecciones por hongos, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (Güngör, *et al.*, 2013).

Los signos y síntomas que producen varias infecciones fúngicas son difíciles de distinguir clínicamente una de otra. Para su diagnóstico y apropiado tratamiento, se requiere una caracterización mediante cultivos *in vitro*, los cuales en algunas poblaciones con condiciones sanitarias precarias son imposibles de realizar (Yehia, *et al.*, 2010).

Aunque se desconoce, el número de especies de hongos existentes en el planeta, en la actualidad están identificadas alrededor de 100.000 especies, que corresponden aproximadamente al 10 % de las encontradas en la naturaleza, de ellas 200 causan micosis en el ser humano, 20 causan micosis generalizadas y cutáneas y 12 micosis subcutáneas graves (Zapata, 2000) (Rueda, 2002).

Las micosis superficiales se encuentran entre las formas más frecuentes de infecciones en los humanos. Se estima que afectan un 20-25 % de la población mundial y su incidencia está constantemente en aumento (Vena, *et al.*, 2012) (Havlickova, *et al.*, 2008) (Das, *et al.*, 2007). La distribución de estas infecciones y sus agentes causales varían según la región geográfica y está influenciada por varios factores, como el tipo de población, clima, estilo de vida, migración, prácticas culturales, condiciones socioeconómicas, entre otras (Ameen, 2010) (Havlickova, *et al.*, 2008) (Schwartz, 2004).

Estudios epidemiológicos recientes, han demostrado que, aparte de alterar *per se* la calidad de vida, (relaciones personales, nivel psicológico, deambulaci3n...), tambi3n pueden dar lugar a complicaciones poco deseables, provocando cuadros infecciosos y bacterianos, que suponen un alto gasto sociosanitario al ocasionar perturbaci3n ocupacional, deterioro psicol3gico y f3sico, y una potencial estigmatizaci3n social (L3pez, *et al.*, 2015).

Actualmente, este tipo de infecciones son un frecuente motivo de consulta para el m3dico de familia (Hern3ndez, *et al.*, 2014) y el dermat3logo. Lo cual nos obliga a permanecer constantemente actualizados.

La candidiasis es la micosis emergente con mayor efecto en el ser humano debido a su frecuencia y a la gravedad de sus complicaciones (L3pez-Mart3nez, R., 2010).

La candidiasis superficial es una de las formas cl3nicas m3s comunes. Es caracter3sticamente cr3nica y recurrente, y, a veces, indica el comienzo de las formas graves de esta micosis (Pappas, *et al.*, 2009).

Las especies del g3nero *Candida* son las que se relacionan m3s a menudo con patolog3a humana, principalmente *Candida albicans*, pero desde hace unos a3os otras especies han sido descritas como pat3genos emergentes (Garc3a-Martos, *et al.*, 2001) (Sanz, *et al.*, 2015) (Vega-S3nchez, *et al.*, 2015).

Las infecciones f3ngicas invasivas est3n en constante crecimiento en todo mundo. De ellas el 90 %, a nivel hospitalario, est3n producidas por especies de los g3neros *Candida* y *Aspergillus*, y poseen una elevada tasa de mortalidad. La infecci3n invasiva suele producirse a partir de la piel y las mucosas (Fern3ndez, *et al.*, 2005). Favorecen su expansi3n la extensi3n de la superficie colonizada y la densidad de la poblaci3n de *Candida*, as3 como otros factores asociados: la p3rdida de la integridad de la piel y mucosas, el empleo de antibi3ticos de amplio espectro, el n3mero de antibi3ticos empleados, la duraci3n del tratamiento, los episodios de bacteriemia, la nutrici3n parenteral, el tratamiento con corticoides y enfermedades como la diabetes (Fern3ndez, *et al.*, 2005) (Pfaller, *et al.*, 2007) (Abu-Elteen, *et al.*, 2006). Adem3s de todos los factores nombrados anteriormente, la inmunodepresi3n cobra cada vez m3s

importancia por el incremento de pacientes inmunodeprimidos. (Pereiro, *et al.*, 2010) (Pereira, *et al.*, 2014). Los principales grupos de inmunodeprimidos con riesgo aumentado de micosis son los pacientes con VIH y los transplantados de órganos hematopoyéticos o de órganos sólidos (De Paw, *et al.*, 2008).

Este hongo tiene una distribución mundial y afecta a personas de todas las edades, con una preferencia por ciertos profesionales, como trabajadores domésticos, lavanderas, cocineras y enfermeras (Campanha, *et al.*, 2007).

Las levaduras del género *Candida* son microorganismos pertenecientes a la microbiota normal de individuos sanos, principalmente en la mucosa oral, el tracto gastrointestinal y el tracto genitourinario femenino (Shao, *et al.*, 2007). Sin embargo, estos hongos son responsables de diferentes manifestaciones clínicas, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, que van desde infecciones de la piel y mucosas a infecciones sistémicas (Sardi, *et al.*, 2013). Su importancia viene de la alta frecuencia con que colonizan e infectan el huésped humano (De Bernardis, *et al.*, 2004), siendo el cuarto patógeno más común asociado con los casos de infección nosocomial (Wisplinghoff, *et al.*, 2004).

El tratamiento de las micosis es otro reto importante. A pesar de los nuevos y más eficaces medicamentos antimicóticos, las terapias a menudo fallan debido a la ignorancia con respecto a las dosis y regímenes terapéuticos, o a su creciente resistencia a los antifúngicos (López-Martínez, 2010).

Actualmente, los antimicóticos o antifúngicos se pueden clasificar en dos categorías que corresponden a las clases de micosis, es decir, los que poseen actividad sistémica y los de aplicación local. Por ejemplo, los antimicóticos del tipo del imidazol, triazol y polienos pueden utilizarse por vía sistémica y local, y de modo similar muchas micosis superficiales pueden ser tratadas con medidas sistémicas o locales (Goodman, *et al.*, 1996) (Huanca, *et al.*, 2012).

Los productos antifúngicos tópicos representan un 16 % del total de productos dermatológicos, con un crecimiento por encima del 4 % anual y un 65 % del consumo total de antifúngicos (Alou, *et al.*, 2001). Las cremas y las formulaciones en gel y/o solución son las más usadas y, además, presentan un mayor incremento del consumo,

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

dado que cada día son terapéuticamente más eficaces y presentan pocos efectos secundarios (Crespo, *et al.*, 2005).

El tratamiento de infecciones locales fúngicas usando formulaciones tópicas presenta algunas características ventajosas, tales como posibilidad de acción en el sitio de aplicación, la reducción del riesgo de efectos secundarios sistémicos aumentando la eficacia de la terapia y su aceptación por los pacientes (Güngör, *et al.*, 2013), la ausencia de interacciones con otros medicamentos orales o parenterales que pueden aparecer con los antifúngicos orales, no requerir la monitorización del paciente con pruebas analíticas, y la buena relación coste-eficacia en determinadas situaciones clínicas (Maestre, *et al.*, 2001). Además del tratamiento farmacológico, el tratamiento tópico de las micosis cutáneas superficiales comprende una serie de medidas higiénicas, dirigidas a evitar la propagación de la infección y la autocontaminación (Gimeno-Carpio, 2006).

En la actualidad, se considera que el fármaco antifúngico ideal debe tener una actividad de amplio espectro, ser eficaz a bajas concentraciones, ser fungicida más que fungistático, ser eficaz por vía tópica, tener alta afinidad por el estrato córneo, ser bien tolerado, no ser sensibilizante, no desarrollar resistencias y permitir una dosificación cómoda para asegurar el agrado del paciente y con buena relación coste-eficacia (Maestre, *et al.*, 2001) (Brennan, *et al.*, 1997) (Carrillo-Muñoz, *et al.*, 2009).

Los tratamientos convencionales de infecciones fúngicas se basan actualmente en unos pocos agentes tales como azoles y polienos (nistatina), que tienen serios problemas relacionados con la eficacia, espectro de actividad, toxicidad, baja potencia y farmacocinética inadecuadas (Scott, *et al.*, 2012). Por otra parte, la aparición de resistencia microbiana a los agentes antimicrobianos muestra un problema creciente de la salud pública en todo el mundo y el mayor obstáculo para el éxito de un tratamiento (Oliveira, *et al.*, 2008) (Benghezal, *et al.*, 2007).

Debido al uso frecuente de antifúngicos para el tratamiento de estas infecciones y al aumento de las dosis terapéuticas, se ha constatado la aparición de resistencias (Muthu, *et al.*, 2012), especialmente frente a derivados azólicos, lo que ha conducido a

la necesidad de efectuar estudios de sensibilidad *in vitro* para predecir la eficacia de los antifúngicos, antes de instaurar un tratamiento (García-Martos, *et al.*, 2001).

Otro aspecto relevante de las infecciones fúngicas se relaciona con el coste del tratamiento. Si atendemos al gasto farmacéutico global ocasionado, su importancia es enorme, y el consumo de fármacos antifúngicos no ha parado de crecer en el mundo durante las últimas décadas (Maestre, *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta la necesidad de medicamentos más efectivos y que presenten menos resistencias en la terapia antifúngica a nivel mucocutáneo, en el presente trabajo se ha seleccionado la anfotericina B por ser uno de los antifúngicos de más amplio espectro, así como de más bajo índice de aparición de resistencias (Manzano, *et al.*, 2008). Se desarrollaron y ensayaron diversas formulaciones tópicas cuyo principio activo en común es el anteriormente nombrado, anfotericina B (AmB), junto con distintos excipientes, que favorecen su penetración a través de la piel, actuando de forma local. Finalmente, se realizó un estudio comparativo entre las distintas formulaciones desarrolladas con el objeto de determinar las características farmacotécnicas y microbiológicas de cada una de ellas, con el fin de seleccionar las más adecuadas para posteriores estudios clínicos.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

Considerando la creciente importancia y repercusión clínica de las infecciones causadas por hongos, se hace necesario el desarrollo de nuevas formulaciones que vengán a reforzar el arsenal terapéutico actual.

En este sentido, nuestro equipo de investigación viene realizando en los últimos años una serie de estudios conducentes al desarrollo de nuevas formulaciones con anfotericina B (AmB), con mayor eficacia terapéutica y menores efectos adversos que las fórmulas actuales (Sánchez-Brunete, 2003) (Valdespina, 2007) (Espada, 2008) (Ruiz, 2010) (Serrano, 2013).

Basándonos en los prometedores resultados obtenidos en estudios previos, el objetivo primordial del presente trabajo consiste en el desarrollo y optimización de una fórmula de uso tópico con AmB en forma de pomada, para el tratamiento local de infecciones fúngicas a nivel superficial.

Para la consecución de este objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos que conforman el planteamiento del trabajo de investigación:

1. Diseño de formulaciones semisólidas de AmB en forma de pomada. Para ello se selecciona el excipiente Orabase® como base de la formulación y se estudia la incorporación de distintos promotores de penetración cutánea a diferentes proporciones, para seleccionar la opción más adecuada.
2. Preparación de AmB encapsulada en ciclodextrinas mediante procedimientos de co-precipitación por liofilización, desarrolladas en estudios previos (Ruiz, 2010). Incorporación del complejo encapsulado en una formulación semisólida con la misma base que la utilizada en el punto anterior.
3. Caracterización farmacotécnica de las formulaciones obtenidas (AmB en Orabase®, AmB en Orabase® con ciclodextrinas, y AmB en Orabase® con promotor seleccionado), incluyendo análisis de la dosis de AmB mediante HPLC, y caracterización reológica: extensibilidad, viscosidad, tixotropía, etc.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

4. Estudios de difusión *ex-vivo* utilizando piel dorsal de ratón sin pelo (Hairless-Mouse SKH1-HRBR-Charles River) con las tres fórmulas desarrolladas. Análisis comparativo de la capacidad de penetración de la AmB en celdas de difusión de flujo continuo.
5. Experimentos de eficacia microbiológica *in vitro* con diferentes cepas de los géneros *Candida* y *Saccharomyces*.
6. Análisis comparativo de datos y selección final de formulaciones.

3. PARTE TEÓRICA: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Micosis superficiales y vía tópica

3.1.1 Descripción general

Los hongos son capaces de producir en el ser humano infecciones que clásicamente se han estudiado siguiendo criterios de orden topográfico. En líneas generales, cabe distinguir tres grandes grupos: micosis superficiales (cutáneas o mucosas), subcutáneas u osteoarticulares y profundas o sistémicas (Crespo, 2006) (Crespo, *et al.*, 2004). En época relativamente reciente, algunos autores (Rippon, 1988) han llevado a cabo una subdivisión en el primero de estos grupos, distinguiendo, por un lado, las micosis superficiales, en sentido estricto, que englobarían procesos de localización más externa situados en las capas superiores del estrato córneo (pitiriasis versicolor, piedras y tinea nigra), y por otro, las micosis cutáneas, donde se produciría una invasión algo más profunda de las estructuras queratinizadas, sobre todo en los anejos y de las mucosas, y que incluiría las dermatofitosis o tiñas y las candidiasis de localización cutánea o mucosa.

Las micosis superficiales han sido objeto de conocimiento y descripción desde la antigüedad. Existe ya una referencia al micetoma del pie (descrito como «pie hormiguero») en los libros del Atharva Veda, en la India, en el segundo milenio a. C. Y son igualmente clásicas las descripciones del «muguet» bucal por el griego Hipócrates (437-377 a. C.) y por los médicos romanos del siglo I de nuestra era, Galeno (*aphtae albae*) y Celso, quienes dio nombre a la dermatoficia inflamatoria o querion (Crespo, *et al.*, 2004). El desarrollo de las lentes microscópicas a lo largo de los siglos XVI y XVII, permitió que se llevaran a cabo, en la segunda mitad de la última centuria, las primeras descripciones rudimentarias de ciertos micromicetos dotados de estructuras de gran tamaño, como los del género *Mucor*. Pocos años más tarde, ya en el siglo XVIII, basándose en el sistema de clasificación que acababa de desarrollar el gran naturalista Carl von Linné (1707-1778), el botánico Pier Antonio Micheli (1679-1737), conservador de los jardines de Florencia, publica en 1729 la primera gran monografía sistemática sobre micromicetos (*Nova plantarum genera*), texto que se considera no sólo la primera piedra miliar, sino también el punto de partida de la micología como ciencia. En él encontramos las primeras descripciones detalladas de muchos de los hongos más

conocidos, como *Mucor* y *Botrytis*, y particularmente de especies del género *Aspergillus* (Micheli, 1729).

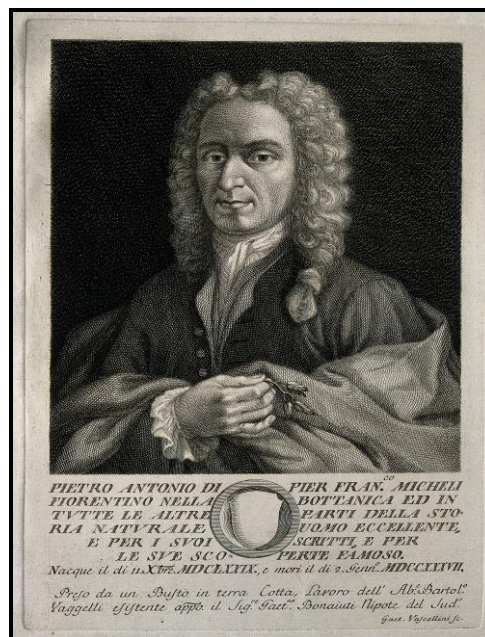


Figura 1. Pier Antonio Micheli.

El descubrimiento del primer microorganismo causante de una enfermedad humana (*favus* humano) corresponde a Remak y Schönlein en 1837. Éstos fueron los primeros en observar estructuras fúngicas, hifas y esporas en el material obtenido de las costras de un paciente afectado de *favus*.

Sin embargo, los estudios de David Gruby, presentados en la Academia de Ciencias de París entre 1841 y 1844, tuvieron un impacto mucho mayor entre los clínicos de la época (Gruby, 1841a) (Gruby, 1841b) (Gruby, 1843) (Gruby, 1843) (Gruby, 1844). De hecho, Gruby, un judío de origen húngaro que ejercía de oftalmólogo en París, logró, además de la observación microscópica del hongo, obtener éste en cultivo e inocularlo con éxito en el brazo de su ayudante y en su propio cuerpo. Describió el principal agente de *tinea capitis* en aquella y lo bautizó como *Microsporum audouinii*. Por último, en 1841 Gruby describió también la levadura causante del “muguet” o candidiasis oral, a la que 6 años más tarde Robin denominaría *Oidium albicans* (*Candida albicans*). Esta especie estuvo incluida en cien sinónimos y pasada a través de dieciocho géneros. De estos géneros, sólo dos han prevalecido por largo

tiempo para referirse a esta especie: el Género *Monilia*, en el cual estaba incluida la especie *Monilia candida* (Plaut, 1885), luego *Monilia albicans* (Zopt, 1890) que dominó la literatura hasta el trabajo de C. M. Berkhout, quien en 1923 propone el Género *Candida* y la especie *C. albicans*, que fue aceptado por el Tercer Congreso Internacional de Microbiología de Nueva York en 1939. Desde entonces, se pasaron al Género *Candida* todas aquellas levaduras que no encajaban en el Género *Monilia*, por lo cual todas las afecciones producidas por *Candida* se conocen con el nombre de candidiasis (Samson, 1990) (Casas, 1989).

Ya en el siglo XX, Conant y sus colaboradores publicaron el que estaba llamado a ser el texto más influyente en la historia de la micología médica (Conant, *et al.*, 1944). El texto, titulado *Manual of clinical mycology*, sus sucesivas ediciones (1954 y 1971) y los cursos anuales que el mismo Conant impartió a lo largo de veinticinco años en la Duke University, tuvieron una profunda influencia en la difusión del conocimiento de las micosis y sus agentes causales, hasta el punto de que, al decir de Ajello, la historia de la micología médica puede dividirse en dos períodos: AC y DC (antes de Conant y después de Conant) (Ajello, 1975).

Actualmente, se desconoce el número de especies de hongos existentes en el planeta, aunque están identificadas alrededor de 100.000 especies, que corresponden aproximadamente al 10 % de las encontradas en la naturaleza, de ellas 200 causan micosis en el ser humano, 20 causan micosis generalizadas y cutáneas, y 12 micosis subcutáneas graves (Zapata, 2000) (Rueda, 2002) (Aguirre-Acosta, *et al.*, 2014).

Existen distintos tipos de micosis superficiales que se pueden clasificar atendiendo a su agente etiológico. En el siguiente cuadro (tabla 1) se pueden observar las distintas variedades, de las cuales, las de mayor relevancia son: la pitiriasis versicolor, las producidas por los dermatofitos y las candidiasis.

Infecciones por levaduras <ul style="list-style-type: none"> • Candidiasis cutáneas y/o mucosas • Pitiriasis versicolor • Piedra blanca 	<i>Candida</i> spp. <i>Malassezia globosa</i> , <i>M. furfur</i> <i>Trichosporon</i> spp.
Infecciones por hongos filamentosos <ul style="list-style-type: none"> • Dermatofitosis o tiñas • Tinea nigra • Piedra negra • Infecciones dermatofitosis-like • Infecciones por mohos 	<i>Dermatófitos</i> (<i>Microsporum</i> , <i>Trichophyton</i> , <i>Epidermophyton</i>) <i>Hortaea werneckii</i> <i>Piedraia hortae</i> <i>Scytalidium</i> spp. <i>Onychocola canadensis</i> (onikomikosis...) <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. sydowii</i>) <i>Acremonium</i> spp. (<i>A. potronii</i>) <i>Fusarium</i> spp. (<i>F. oxysporum</i>) <i>Alternaria</i> spp. <i>Curvularia lunata</i> <i>Chaetomium globosum</i>

Tabla 1. Clasificación de las micosis superficiales (Crespo, 2006).

Pitiriasis versicolor

Es una infección crónica, asintomática, de las capas más superficiales de la piel, causada por diversas especies de *Malassezia* (Crespo, *et al.*, 2002) (Velegraki, *et al.*, 2015), levaduras lipofílicas que forman parte de la flora normal de la piel; es particularmente densa la colonización en la piel del cuero cabelludo, el tronco y las áreas flexurales. La especie etiológica más frecuente en España es *Malassezia globosa* (Crespo, *et al.*, 2001) (Martín, *et al.*, 2010). Bajo circunstancias no bien determinadas se hace patógena, y entonces adopta una forma filamentosa. Su crecimiento se ve favorecido en condiciones de calor y humedad, y en los estados de inmunosupresión.

Es una micosis de distribución universal, más frecuente en países con climas cálidos y húmedos. Afecta a todas las razas y es algo más frecuente en los varones que

en las mujeres. La mayoría de los casos se observa en adolescentes y jóvenes adultos, deportistas, que frecuentan gimnasios, piscinas, saunas, etc. y es muy rara antes de los 5 años y después de los 60 (Szepietowski, *et al.*, 2000).

Clínicamente se manifiesta como máculas pequeñas, de color pardo claro, cubiertas por una ligera descamación; suelen ser muy numerosas y pueden confluir unas con otras. Se localizan en región cervical, parte superior de tronco y raíz de extremidades superiores (Bouza, *et al.*, 2001).

Dermatofitosis

Son los cuadros clínicos producidos por hongos dermatofitos: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, que afectan a piel, pelo y/o uñas.

Tiñas del cuero cabelludo (tinea capitis)

Tiñas tonsurantes. Pueden estar producidas por *Microsporum* o por *Trichophyton*. Tienen de común el que aparecen en edad escolar, son muy contagiosas y curan espontáneamente al llegar a la pubertad. Lo que las diferencian es que, en las microspóricas suele haber una única o escasas placas, de mayor tamaño, en la que todos los pelos están afectados (tonsura perfecta) y se rompen a pocos milímetros de su emergencia en la piel. Y en las tricofíticas, existen varias placas de pequeño tamaño y en ellas coexisten pelos sanos y parasitados, que están rotos en su emergencia en la piel (tiña de los puntos negros) o muy poco por encima de ésta. (Ferrándiz, C., *et al.*, 2006).

Tiñas inflamatorias (Querión de Celso). Se manifiestan como placas únicas, alopécicas, de aspecto muy inflamatorio, con intenso eritema, sobreelevación, con múltiples puntos de supuración a nivel folicular, que se desecan formando costras. No se acompaña de afectación del estado general y al curar pueden dejar alguna zona alopécica cicatricial. Este tipo de tiña también se puede observar en la barba y otras zonas pilosas.

Favus. El agente etiológico es el *Trichophyton schonleinii*. Se produce en personas con situación higiénica muy deficiente. Es un cuadro muy poco frecuente que

se caracteriza por la presencia de las típicas cazoletas fávicas (pústulas foliculares que se desecan y solidifican). Tiende a la curación espontánea cuando ha provocado una alopecia cicatricial total.

Tiña corporal (tinea corporis)

Se da este nombre a las dermatofitosis que afectan a la piel glabra del tronco o de las extremidades con excepción de las palmas, las plantas y las áreas flexurales. Puede afectar a individuos de cualquier edad. Son muy frecuentes en nuestro medio. Se contagian generalmente, por contacto con animales enfermos: perros, gatos, conejos, etc. Se presenta como una o varias placas redondeadas que crecen centrífugamente con un borde bien delimitado, elevado, a menudo escamoso y/o pustuloso, y siempre más activo que el centro de la lesión, lo que le confiere un aspecto anular muy característico. Cuando las lesiones son múltiples, a veces, confluyen formando placas de bordes policíclicos. En general, las lesiones son pruriginosas. Hay una forma especial denominada granuloma de Majocchi, en general causada por *Trichophyton rubrum*, en el que las lesiones son más profundas, a menudo granulomatosas y se manifiestan por pápulas violáceas agrupadas en placas irregulares, que cuando curan pueden dejar cicatriz residual.



Figura 2. Tinea corporis (Cortesía del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Príncipe de Asturias).

Tiña inguinal (tinea cruris)

Eccema marginado de Hebra. Se observa preferentemente en varones jóvenes y deportistas. Son placas eritematoescamosas, de borde más intenso y marcado, que se localizan en pliegues inguinales y cara interna de los muslos. Crecen extendiéndose hacia la zona distal de los mismos. Suele ser bilateral, con tendencia a la simetría. El contagio ocurre a través de objetos contaminados (ropa, toallas, etc.) y por autoinoculación a partir de lesiones interdigitales en los pies debidas a infecciones, a veces asintomáticas, en esta área.

Tiña de manos y pies (tinea pedis)

También se le conoce con el nombre de pie de atleta. Es la forma de dermatofitosis más frecuente en la población general y a menudo se confunde con otros procesos como la dermatitis plantar juvenil. Existen varias formas clínicas, y la mayoría de las veces se presenta de forma bilateral y afecta a ambos pies simultáneamente.



Figura 3. Pie de atleta (<http://fungicid.com/>).

Intertriginosa. Se caracteriza por eritema, maceración y descamación de los pliegues interdigitales, a menudo con fisuración del fondo del pliegue. El cuarto espacio interdigital es el afectado con mayor intensidad y frecuencia, hasta el punto que la

afección de los otros espacios interdigitales, con preservación del cuarto, debe hacernos pensar en otros diagnósticos. En esta forma, muchas veces asintomática y que a menudo no se le presta la debida atención, las grietas o las fisuras de la epidermis del fondo del pliegue interdigital son una excelente puerta de entrada a infecciones estreptocócicas o estafilocócicas, que causan brotes repetidos de linfangitis y celulitis en la extremidad correspondiente.

Hiperqueratósica. Caracterizada por un discreto eritema e hiperqueratosis que afecta a la planta, bordes laterales y talones, que a veces se extiende al dorso de los pies, adoptando una forma en mocasín.

Dishidrosiforme. Esta forma, a diferencia de las anteriores, es en general unilateral y se caracteriza por el brote de vesículas de contenido claro, agrupadas sobre base inflamatoria; a menudo las vesículas se transforman en pústulas por sobreinfección. Cuando se rompen, dan lugar a erosiones con un borde anular e irregular. A nivel de las manos tienden a localizarse en la región tenar e hipotenar, y en los pies en la arcada plantar.

Tiña de la uñas u onicomycosis

Cursa con engrosamiento de la uña, pérdida de brillo, color parduzco o grisáceo, despegamiento e hiperqueratosis subungueal, pudiendo llegar a la destrucción de la lámina ungueal.

Candidiasis

El género *Candida* está conformado por un amplio grupo de levaduras que abarca unas 200 especies (Ferrer, 2000) (Segal, 2005) (Estrada, *et al.*, 2015). De ellas, aproximadamente 20 están asociadas con infecciones en humanos y animales, y *C. albicans* es la especie más frecuentemente implicada no sólo en las candidiasis superficiales, sino también en las sistémicas (Segal, 2005).

Taxonómicamente hablando, el género *Candida* lo podemos incluir dentro de:

Reino: Hongo

División: Deuteromycota

Clase: Blastomycetes

Familia: Cryptococcaceae

Género: *Candida*

Especies: *albicans* (como la más frecuente y virulenta) y otras especies (Casas, 1989).

C. albicans es un microorganismo oportunista que forma parte de la microbiota del área mucocutánea, gastrointestinal y genitourinaria en el ser humano sano (De la Calle-Rodríguez, 2012), y coloniza las membranas mucosas en el 30-60 % de las personas (Lim, *et al.*, 2012). Es la especie aislada con una mayor frecuencia a partir de muestras clínicas, y generalmente representa entre un 90 % y un 100 % de las cepas aisladas de muestras de mucosa, y entre un 50 % y 70 % de las cepas procedentes de pacientes con infecciones nosocomiales.

La presencia de *C. albicans* como comensal en las membranas mucosas de sujetos asintomáticos es común, por lo que en sujetos sanos, existe un equilibrio entre los mecanismos de defensa del hospedador y el potencial invasivo por parte de las levaduras (Sykes, 1997). Sin embargo, cuando el sistema de defensa del hospedador se daña, tal y como ocurre en sujetos inmunosuprimidos o médicamente comprometidos, la infección por *C. albicans*, así como por otras especies de *Candida*, puede derivar en el establecimiento de un candidiasis, la cual se puede manifestar bien sea de manera superficial, involucrando la mucosa bucal, o diseminada, la cual constituye una forma invasiva más seria (Sykes, 1997) (Shepherd, 1986) (Barberán, *et al.*, 2008) (Pereiro, *et al.*, 2010) (Méndez-Tova, *et al.*, 2012) (Hernández-Solís, *et al.*, 2014). Los principales grupos de inmunodeprimidos con riesgo aumentado de micosis (De Paw, *et al.*, 2008) son los pacientes con VIH y los trasplantados hematopoyéticos y de órganos sólidos. Entre otros grupos de gran importancia se encuentran los pacientes con tratamiento crónico de corticoides, diabéticos (Pereiro, *et al.*, 2010), pacientes con tratamiento quimioterápico, etc (Hernández-Solís, *et al.*, 2014).

C. albicans suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas. Sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí (Samson, 1990) (Volk, 2012) (Webb, 1998).

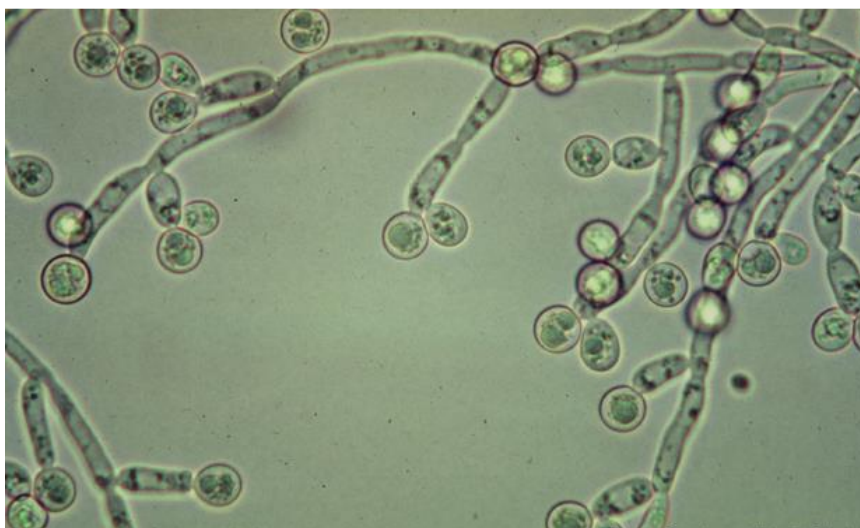


Figura 4. Blastoconidias y pseudohifas de *C. albicans* (Murray, *et al.*, 2006).

Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastospora. Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células (Webb, 1998).

La composición química de *C. albicans* está representada por 20-40 % de proteínas y 30-50 % de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable (Ghannoum *et al.*, 1986). La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono (Pierce, *et al.*, 1978).

Las infecciones por *Candida* están condicionadas por factores locales y generales que provocan la transformación de un agente saprófito en patógeno en determinados individuos (tabla 2) (Roderick, 1999) (Hernández-Solís, *et al.*, 2014).

Factores mecánicos
<ul style="list-style-type: none"> • Traumatismos (quemaduras, abrasiones...) • Oclusión local, humedad, y/o maceración (dentaduras, vendaje o prendas oclusivas, obesidad)
Factores nutricionales
<ul style="list-style-type: none"> • Avitaminosis • Deficiencia de hierro (candidiasis mucocutánea crónica)
Malnutrición generalizada
<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones fisiológicas • Edades extremas • Embarazo • Menstruación
Enfermedades sistémicas
<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Down • Acrodermatitis enteropática • Diabetes mellitus y otras endocrinopatías (Cushing, hipoadrenalismo, hipotiroidismo, hipoparatiroidismo) • Uremia • Cáncer (especialmente hematológico) • Estados intrínsecos de inmunodeficiencia (sida, síndrome hiper IgE, síndrome de inmunodeficiencia combinada grave, enfermedad granulomatosa crónica...)
Causa iatrogénica
<ul style="list-style-type: none"> • Radiaciones ionizantes • Glucocorticoides y otros medicamentos inmunosupresores • Antibióticos (de amplio espectro, metronidazol) • Anticonceptivos orales (especialmente estrogenodominantes) Colquicina, fenilbutazona, tranquilizantes

Tabla 2. Factores predisponentes para candidiasis (Rodríguez-Pichardo, *et al.*, 2006).

Hoy se está encontrando un aumento de otras especies del género *Candida* en las infecciones causadas por este hongo. Si bien *C. albicans* se mantiene a la cabeza como principal patógeno implicado, es de resaltar que otras especies como *C. glabrata* (Hernández-Solís, *et al.*, 2014), *C. krusei* (Sanz, *et al.*, 2015) y *C. parapsilopsis* (Kremery, *et al.*, 2002) (Pfaller, *et al.*, 2000) (Fidel, *et al.*, 1999), así como *C. tropicales*

(Fidel, *et al.*, 1999) (Araújo, *et al.*, 2015) y *C. dubliniensis* (De Bernardis, *et al.*, 1999) (Böttcher, *et al.*, 2015), van aumentando su prevalencia de manera notable. Aunque no se sabe el porqué de esta tendencia, puede que el uso extendido de los azoles esté llevando a un incremento de especies resistentes a ellos (Vega-Sánchez, *et al.*, 2015)

Especies	Oral	Vaginal	Cutáneo	Ungueal	GI	Sistémico	Fungemia
<i>C. albicans</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. glabrata</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. tropicales</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. krusei</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. guilliermondii</i>	X	X		X			
<i>C. parapsilosis</i>	X		X	X	X	X	X
<i>C. kefyr</i>	X	X					X
<i>C. dubliniensis</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. famata</i>			X	X		X	X
<i>C. lipolytica</i>							X
<i>C. norvegensis</i>					X	X	X
<i>C. lusitaniae</i>						X	X

Tabla 3. Principales especies de *Candida* causantes de distintas formas clínicas (López-Martínez, *et al.*, 2010).

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Las colonias muy pequeñas aparecen en un lapso de 24 a 36 horas en agar Sabouraud y miden de 1,5 a 2 mm de diámetro, después de 5 a 7 días. Las colonias son típicamente blancas por completo, pero adquieren un color crema o requemado al continuar envejeciendo (Nolte, 1986). Después de 4-5 días se percibe un olor característico de levadura (Webb, 1998) (Nolte, 1986).

Las colonias de *Candida* crecen *in vitro* en condiciones de aerobiosis en medios de cultivo con un pH variable entre 2,5 y 7,5, y temperatura que oscila entre 20 °C y 38 °C. El crecimiento de colonias se puede detectar entre 48 y 72 horas después de la siembra, y los subcultivos pueden crecer más rápidamente. La habilidad de las levaduras de crecer a 37 °C es una característica importante a ser considerada en su identificación a partir de muestras clínicas. Las levaduras más virulentas crecen rápidamente a temperaturas que oscilan entre 25 °C y 37 °C, mientras que las poco virulentas dejan de crecer a 37 °C (Pardi, 2002).



Figura 5. Fotografía de colonias de *C. albicans* en medio agar Sabouraud.

Existen distintas formas clínicas del género *Candida*, como podemos observar en la siguiente tabla (tabla 4).

Candidiasis oral <ul style="list-style-type: none">• Candidiasis aguda pseudomembranosa• Candidiasis aguda eritematosa• Candidiasis crónica pseudomembranosa• Candidiasis crónica eritematosa• Candidiasis crónica hiperplasia• Candidiasis crónica nodular• Queilitis angular• Glositis romboidal media
Candidiasis cutánea <ul style="list-style-type: none">• Intertrigo candidiásico• Candidiasis interdigital• Candidiasis perianal y escrotal• Candidiasis del pañal• Candidiasis nodular o granulomatosa del área del pañal• Candidiasis cutánea congénita
Candidiasis genital <ul style="list-style-type: none">• Vulvovaginitis• Balanitis
Candidiasis de los anejos <ul style="list-style-type: none">• Candidiasis ungueal y paroniquia candidiásica• Foliculitis candidiásica
Candidiasis mucocutánea crónica

Tabla 4. Formas clínicas del género *Candida*.

Candidiasis oral

- **Candidiasis aguda pseudomembranosa.** También conocida como muguet, es la forma más frecuente de candidiasis oral y afecta a más del 5 % de recién nacidos y a un 10 % de pacientes debilitados, hospitalizados o ancianos (Martin, *et al.*, 1993). Se caracteriza por la presencia de una placa pseudomembranosa, de consistencia cremosa, con pequeños grumos blanquecinos que puede ser fácilmente retirada, y deja una superficie eritematosa. Esta membrana está formada por descamación de células epiteliales, fibrina, leucocitos y micelios de hongos que están prendidos en el epitelio inflamado. Puede haber una o más placas, y puede estar afectada la mucosa de las encías, el paladar y las mejillas; en pacientes inmunocomprometidos también puede afectarse la lengua. En casos graves se puede extender a la faringe y el esófago, y pueden aparecer erosiones y úlceras (Rowen, 2003) (Dreizen, 1984).



Figura 6. Candidiasis pseudomembranosa o muguet (Dalmau, *et al.*, 2005).

- **Candidiasis aguda eritematosa (atrófica).** En esta forma existe una intensa inflamación en una mucosa denudada, atrófica y eritematosa (lengua roja, lisa y brillante). Se localiza en el dorso de la lengua y puede ser consecutiva a la forma aguda pseudomembranosa, sobre todo cuando se encuentran restos de membranas (Dreizen, 1984). Se asocia a terapia antibiótica y también al uso de corticoides tópicos, inhalados o sistémicos, pero se puede dar en pacientes VIH+, en cuyo caso la lengua está marcadamente afectada.
- **Candidiasis crónica pseudomembranosa.** Clínicamente no difiere de la variedad aguda, pero es muy persistente, y aparece en pacientes inmunodeprimidos.

- Candidiasis crónica eritematosa (atrófica). Se caracteriza por una placa eritematoedematosa en el paladar duro, y tiene una íntima relación con la superficie de apoyo de las prótesis dentales. De ahí que muchos autores la denominen directamente «estomatitis por prótesis dental». Se han descrito tres formas clínicas: tipo I o localizada (pequeña área de hiperemia), tipo II o generalizada (eritema difuso de toda la superficie de contacto con la dentadura), tipo III o papilar (lesiones papulosas en el centro del paladar y/o el reborde alveolar). En la etiopatogenia del cuadro parece tener un papel relevante la proliferación de colonias de *C. albicans* en la prótesis dental (Mathaba, *et al.*, 1995) 47, posiblemente gracias a la capacidad que tiene el microorganismo de sintetizar un biofilm que le permite adherirse a las estructuras sintéticas. Este contacto íntimo y diario causaría una estomatitis crónica. Otros factores como las sinergias bacterianas, la irritación mecánica o fenómenos alérgicos al material de la prótesis también han sido relacionados con la entidad (Budtz-Jorgensen, *et al.*, 1975). Clínicamente suele ser asintomática, aunque en algunas ocasiones hay dolor o molestias locales. A la hora del tratamiento, aparte del antifúngico tópico, es muy importante realizar una adecuada limpieza de la prótesis y mejorar el ajuste.

- Candidiasis hiperplásica crónica. También denominada leucoplasia candidiásica, esta forma clínica por lo general se presenta como placas blanquecinas aisladas, aunque su apariencia clínica puede ser más variable. De ahí que puedan aparecer pequeñas y discretas lesiones, palpables, translúcidas y blanquecinas, o por el contrario placas más densas y opacas que se muestran duras y rugosas a la palpación (Ellepola, *et al.*, 2000). Estas lesiones se presentan en la mucosa geniana, la zona comisural y, menos frecuentemente, en la superficie lingual. Dada esta apariencia clínica, es importante realizar, aparte del estudio micológico, un estudio histopatológico para descartar malignidad de la lesión.

- Candidiasis nodular crónica. Es una rara forma que afecta a la lengua y se presenta con una apariencia de empedrado. Es frecuente en algunos pacientes con candidiasis mucocutánea crónica

- Queilitis angular. Se conoce también como perleche o popularmente boqueras. Consiste en la inflamación de los ángulos de la boca extendida hacia la piel circundante. Es un síndrome no siempre asociado a infección candidiásica, y quizá sea

mejor considerarlo un intertrigo en el que pueden intervenir diferentes microorganismos, y en el que *Candida* es el que se ha involucrado con más frecuencia. También puede ser importante el estado nutricional, los factores mecánicos relacionados con la profundidad del pliegue, la mala oclusión de la dentadura y la presencia de humedad por salivación continuada o por el lamido persistente de los labios (Rodríguez-Pichardo, *et al.*, 2006).

- Glositis romboidal media. Se presenta como un área, más o menos de forma romboidal, con ausencia de papilas y localizada en la zona central y posterior de la lengua. También es conocida como glositis lonsángica (González, *et al.*, 2008).

Candidiasis cutánea

- Intertrigo candidiásico. *Candida* necesita humedad para multiplicarse, por lo que los pliegues pueden ser un lugar idóneo para ello. Esta entidad también se denomina candidiasis flexural y afecta a cualquier pliegue de la piel, sobre todo en personas obesas y diabéticas (Scheinfeld, 2004) (Vázquez, *et al.*, 1995). Las localizaciones más características son las flexuras inguinales y axilares, y los pliegues interglúteo, submamario y/o suprapúbico. Los síntomas típicos son el eritema y una escasa exudación húmeda en la profundidad del pliegue; habitualmente desarrollan los rasgos típicos de candidiasis, con un margen de bordes irregulares y pústulas subcórneas rotas, que dan lugar a una pequeña erosión producida por el despegamiento del estrato córneo. Son clásicas las lesiones satélites, pustulosas o papulosas. En los casos más intensos puede comprobarse una fisura en el fondo del pliegue cubierta por secreción blanquecina muy característica. Es habitual la inflamación y el prurito, que puede ser intenso. La evolución es crónica con brotes agudos.

El arquetipo clásico es el de una mujer obesa, diabética, que realiza una higiene insuficiente. Se ha visto que las ropas oclusivas, los factores ocupacionales, la toma de antibióticos y los factores anteriormente citados favorecen la enfermedad (Pariser, *et al.*, 1990). En el diagnóstico diferencial, habría que descartar varias entidades, principalmente psoriasis invertida, así como dermatitis seborreica, eritrasma o eccemas (irritativo, alérgico de contacto).



Figura 7. Intertrigo candidiásico (<http://web.udl.es/usuaris/dermatol/>).

- **Candidiasis interdigital.** La afección de los espacios interdigitales de pies y manos (*erosio interdigitalis blastomicetica*) es otro de los cuadros clínicos característicos producidos por esta levadura. Afecta principalmente al tercer y el cuarto espacio interdigital de pies y manos, debido a sus características anatómicas. En estas regiones la movilidad es menor, lo que ofrece un aumento de humedad y calor que permite al hongo proliferar.

Es una entidad que afecta fundamentalmente a personas que por su trabajo tienen las manos mojadas continuamente (amas de casa, camareros, cocineros, auxiliares de limpieza, etc). Clínicamente se manifiesta como una placa eritematosa de bordes netos, macerada y con fisura en el fondo del pliegue. Clínicamente se acompaña de escozor, dolor y mal olor cuando aparece en los pies. A la hora de realizar el diagnóstico hay que diferenciarlo de otras afecciones. En los pies hay que realizar el diagnóstico diferencial con las variantes intertriginosas de la *tinea pedis*, intertrigos bacterianos y demás, por lo que en ocasiones es imprescindible el estudio micológico y cultivo de la muestra. En las manos destacan los eccemas irritativos y alérgicos de contacto, así como el dishidrótico.

- **Candidiasis perianal y escrotal.** Esta forma clínica puede aparecer con o sin afección genital. Habitualmente se asienta alrededor de los márgenes de la región anal, con eritema inespecífico, inflamación e irritación que cursa con dolor. La afección del escroto es habitualmente la forma de un eritema indeterminado y raramente se ven pústulas subcórneas. La candidiasis debe incluirse en el diagnóstico diferencial de un

eritema escrotal no explicado. En una psoriasis invertida que afecte al escroto debe considerarse la infección por *Candida*. Se recomienda hacer cultivo, aunque la aparición de lesiones pustulosas satélites pueda ser suficiente para instaurar tratamiento.

- Candidiasis del pañal. *C. albicans* se aísla habitualmente de la piel húmeda de las nalgas y los genitales de los niños, pero es más frecuente cuando la piel está afectada por un eritema del pañal. En algunas ocasiones se encuentran las clásicas pústulas subcórneas, con un borde de márgenes irregulares y lesiones satélites. En estos casos no hay duda de que estos organismos desempeñan un papel patogénico y son fácilmente identificados en las heces. En otros casos indeterminados de erupción del pañal, en los que el organismo es aislado, es dudoso el papel patógeno de los hongos.

Las cremas de esteroides aplicadas en esta localización no sólo modifican los rasgos clínicos sino que probablemente benefician el crecimiento de *Candida*; por otra parte, si se suprime la flora bacteriana con una crema de antibióticos también se favorece el crecimiento de *Candida*. Estos factores deben tenerse en cuenta en cualquier dermatosis del pañal (Rowen, 2003).

A veces se asocia a muguet, y se ha postulado, la posibilidad de que la infección del tracto gastrointestinal posterior sea la causante de la infección en el área del pañal. A su vez, desde la boca de un niño con muguet, *Candida* puede infectar el pezón de la madre durante la lactancia y originar una mastitis candidiásica, caracterizada por fisuras y eritema brillante en el pezón (Francis-Morrill, *et al.*, 2004). En la acrodermatitis enteropática, en la que existe un déficit de cinc, puede haber una infección secundaria por *Candida*, especialmente en el área perianal. En el caso más trivial de erupción del pañal debe tomarse una muestra para saber si *Candida* está presente en la piel afectada. Algunos estiman que la densidad de la colonización es también de ayuda. Si *Candida* está presente en gran número, aunque los rasgos clínicos no sean específicos, está indicado el tratamiento anticandidiásico.



Figura 8. Candidiasis del pañal (<http://web.udl.es/usuaris/dermatol/>).

- Candidiasis nodular o granulomatosa del área del pañal (granuloma gluteale infantum). Esta entidad, descrita por primera vez en 1971 (Hay, *et al.*, 2004), sigue siendo toda una incógnita en cuanto a su etiología se refiere. Parece desencadenarse en los lactantes que han sido tratados con corticoides tópicos por haber padecido una dermatitis irritativa del pañal, y varios casos publicados ponen de manifiesto la presencia de *C. albicans* en las lesiones (Scheinfeld, 2004). Consiste en una erupción del pañal que se extiende por las nalgas, los genitales, las raíces de los miembros y el pubis, con el desarrollo de nódulos, a veces de hasta 2 cm de diámetro, de color azulado o pardusco. Puede comenzar sólo con los nódulos y, en algunos casos, tiene importante descamación e hiperqueratosis por encima de las lesiones; en otros, la epidermis aparece normal. Histológicamente se observa un marcado infiltrado dérmico con linfocitos, eosinófilos e histiocitos. Esta entidad no es admitida por todos los autores y no siempre se demuestra la presencia de *Candida* en la superficie de la lesión.

- Candidiasis cutánea congénita. Síndrome raro que se presenta en el momento del nacimiento o durante las primeras 24 horas de vida. El microorganismo pasa de la vagina de la madre al útero, del útero al líquido amniótico, y de ahí al feto (Klenk, *et al.*, 2005). Clínicamente presenta tres estadios evolutivos: una erupción maculopapulosa rosada, que evoluciona a una forma vesiculopustulosa y remite en una tercera fase descamativa. Estas lesiones predominan en la mitad superior del tronco; es

frecuente ver lesiones en distintos estadios evolutivos, y la presencia de muguet es rara. Generalmente este cuadro tiene una evolución favorable y únicamente habría que prestar mayor atención a recién nacidos pretérmino. En los nacidos sanos con peso normal, el proceso suele limitarse a la piel y se resuelve con tratamientos tópicos. En el caso de neonatos prematuros o de bajo peso y en caso de rotura de membranas prolongada, el proceso cutáneo puede volverse invasivo y así puede desarrollarse una candidiasis diseminada (Faix, *et al.*, 1992).

Candidiasis genitales

- Vulvovaginitis candidiásica. Vulvovaginitis se define como la inflamación de la vulva y la vagina que se acompaña de síntomas diversos como leucorrea, prurito, escozor, disuria y dispareunia. Es uno de los motivos más frecuentes de consulta ginecológica y dermatológica, tanto en atención primaria como especializada, donde constituye el 25 % de las consultas (Kent, 1991). La vulvovaginitis candidiásica es una infección frecuente en mujeres jóvenes que se acompaña de morbilidad y costes de salud considerables. Constituye hasta el 30 % del total de las vulvovaginitis (Nyirjesy, 2001) (McCormack, *et al.*, 1994) (Sobel, 2007). *C. albicans* se puede encontrar formando parte de la flora comensal hasta en el 25 % de las mujeres sanas (Giraldo, *et al.*, 2000) (Carr, *et al.*, 1998). El 75 % de las mujeres tendrán un episodio de vulvovaginitis candidiásica y de ellas la mitad tendrá un segundo episodio. En un 80-90 % la causa es *C. albicans*; sigue en frecuencia *Candida glabrata* (Ferrer, 2000).

Las pacientes acuden a consulta por un flujo vaginal blanquecino y grumoso que se acompaña de escozor, prurito y, ocasionalmente, disuria. En la exploración descubrimos placas blanquecinas en las paredes vaginales sobre fondo eritematoso, que se extienden frecuentemente a la zona vulvoperineal. Esta clínica, junto con un examen directo en el que veamos las levaduras y las típicas pseudohifas, nos da el diagnóstico. Otras especies, como *C. glabrata*, *Candida parapsilopsis*, *Candida krusei* y *Saccharomyces cerevisiae*, sólo muestran blastosporos, por lo que no es posible identificarlas con el examen directo. En estos casos en que el examen directo sea negativo pero la sospecha clínica se mantenga, están indicados los cultivos en agar Sabouraud.

Otro aspecto muy importante de esta enfermedad es su recurrencia. Las formas recurrentes se definen como 4 o más infecciones sintomáticas al año, o cuando se dan 3 episodios no relacionados con la toma de antibióticos en el último año (Ringdahl, 2000) (Fidel, 2006). Las padecen el 5 % de las mujeres y, en la mayoría, las recurrencias se producen en los tres meses siguientes (Spacek, *et al.*, 2005). Entre el 10 y el 33 % de estas formas las producen especies distintas de *C. albicans*, como *C. glabrata* (la más frecuente tras *C. albicans*) (Ferrer, 2000), *Candida tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilopsis* y *S.cerevisiae* (Nyirjesy, *et al.*, 1995) (Ritcher, *et al.*, 2005) (Holland, *et al.*, 2003) (Spinillo, *et al.*, 1997). Varias son las teorías que tratan de explicar el porqué de la recurrencia. Se postuló la teoría del reservorio intestinal como posible explicación a este fenómeno (Miles, *et al.*, 1977), pero no se pudo demostrarla (Fong, 1994). También se postuló la posibilidad de que la recurrencia se debiera a un contagio sexual, ya que en un alto porcentaje de las parejas se detectó el hongo en la boca, los dedos y los genitales (Schmid, *et al.*, 1993). Sin embargo, hoy se cree que la mayoría de las recurrencias se deben más a la persistencia del patógeno en la vagina que a las reinfecciones (Vazquez, *et al.*, 1994) (Magliani, *et al.*, 2002).

- Balanitis. Se estima que *C. albicans* es la causa de un 30-35 % de las balanitis infecciosas (Klenk, *et al.*, 2005). Esta entidad se presenta con mayor frecuencia en varones con fimosis congénita, en aquellos con parejas afectas de vulvovaginitis candidiásica y en los que sufren glucemias elevadas (English, *et al.*, 1995). Otros factores favorecedores son la dermatosis de base, la dermatitis seborreica o la balanopostitis psoriásica. Clínicamente se podría hablar de distintos patrones de presentación: uno papulovesiculoso o papulopustuloso, con lesiones del glande que evolucionan a erosiones superficiales y posteriormente a descamación en collarete. Un segundo patrón, el eritematoedematoso, fugaz y de frecuente presentación tras el coito. Es probable que estos síntomas reflejen una respuesta de hipersensibilidad a colonización/infección candidiásica de la pareja. Y finalmente un tercer patrón, pseudomembranoso, con placas blanquecinas de frecuente aparición en el prepucio. No es infrecuente ver diseminación de la enfermedad hacia los pliegues inguinales y la región escrotal.

El diagnóstico se realiza mediante los hallazgos clínicos y el examen directo, aunque puede ser necesario en muchas ocasiones el cultivo. Plantea el diagnóstico

diferencial con multitud de balanopostitis infecciosas (herpes simple) y no infecciosas (eccema irritativo y alérgico de contacto, psoriasis genital, eritroplasia de Queyrat), que suelen tener características clínicas diferenciadoras, caso de la psoriasis con lesiones en otras localizaciones pero que muy a menudo, como ya comentamos, es necesario realizar una siembra en agar Sabouraud.

Candidiasis de los anejos

- Candidiasis ungueal y paroniquia candidiásica. Al hablar de paroniquia, nos referimos a la inflamación que ocurre alrededor de la uña. La paroniquia candidiásica aparece característicamente en pacientes con tendencia a mojarse las manos (como vimos en la erosio interdigitalis blastomicetica). Clínicamente se observa inflamación en la zona periungueal, generalmente dolorosa, que se acompaña de retracción del pliegue ungular proximal. La paroniquia se presenta fundamentalmente en los dedos índice y medio de la mano dominante, muy a menudo acompañado de un intertrigo candidiásico en el pliegue interdigital correspondiente. No es infrecuente la expulsión de un exudado purulento al tejido periungueal. Como consecuencia, la uña puede verse dañada, y es frecuente la aparición de una onicomycosis subungueal proximal. La tabla ungueal externa puede presentar múltiples ondulaciones, onicólisis y coloración pardoverdosa a lo largo de los laterales (Hay, 1996) (Elewski, 1998). Entre los diagnósticos diferenciales debemos tener en cuenta otras causas de paroniquia: de origen bacteriano, por hiperparatiroidismo, por la enfermedad de Reiter, etc., pero la frecuente asociación con la variante clínica interdigital, así como la presencia en la anamnesis de contacto habitual con el agua, nos harán sospechar una candidiasis. De todos modos habrá varios casos en los que se requiera confirmación mediante cultivo.

- Foliculitis candidiásica: Es una foliculitis de inicio agudo que afecta al cuero cabelludo y a la barba de pacientes adictos a drogas por vía parenteral. Se acompaña de condritis en cartílagos costales y oftalmía uni o bilateral. Se atribuye a la inyección de drogas contaminadas con *Candida* (Delgado, *et al.*, 1994). Se ha asociado al uso de heroína morena y a la utilización de limón para «cortar» la droga, ya que éste es un buen medio de crecimiento para *Candida*.

Candidiasis mucocutánea crónica

La candidiasis mucocutánea crónica (CMCC) consiste en un grupo de síndromes que se caracteriza por candidiasis crónicas superficiales (con afección de piel, uñas y mucosas) sin propensión a la afección sistémica. En general, se trata de niños menores de 3 años que consultan con candidiasis orales o dermatitis del pañal de repetición resistentes al tratamiento. Posteriormente se desarrollan lesiones ungueales, paroniquia y otras lesiones cutáneas. De todas formas existen varios subtipos, según la localización, la forma de herencia, las asociadas o no a endocrinopatías, etc., dando una expresión clínica distintiva a cada una. Existe una clasificación de las CMCC realizada por Higgs *et al* (Higgs, *et al.*, 1974), que las divide en dos grupos, basándose sobre todo en fenómenos clinicopatológicos.

Grupo I. Niños en que se combinan CMCC e inmunodeficiencias graves. Acaban falleciendo por infecciones sistémicas de manera precoz (síndrome de DiGeorge, displasia tímica hereditaria/síndrome de Nezelof, agammaglobulinemia de tipo suizo).

Grupo II. Padecen predominantemente una CMCC desde la infancia y suelen llegar a la edad adulta. Dentro de este grupo se distinguen varios subgrupos:

- CMCC de tipo familiar. Herencia autosómica recesiva (HAR). Buen pronóstico, asocian hiposideremia.
- CMCC difusas. Trastornos de la inmunidad celular. Presentan lesiones ulcerocostrosas en la cara y el cuero cabelludo. Granulomas candidiásicos.
- CMCC con endocrinopatías. HAR. Frecuente hipoparatiroidismo e hipoadrenalismo; también hipotiroidismo o hipopituitarismo.
- CMCC tardías. Afección oral, uñas y mucosas. A partir de la tercera década. Asociada a fenómenos de déficit de la inmunidad celular (hipogammaglobulinemia, leucemias, linfomas, timomas).

Aunque como ya se ha visto la CMCC puede ser variada clínicamente, queremos resaltar un aspecto clínico muy frecuente y característico, que es la afección ungueal y periungueal. La paroniquia inflamatoria es frecuente y tiene un carácter crónico, lo que hace que se invada la uña tempranamente. Esta invasión produce en la uña

engrosamiento y distrofia importante, con una reacción periférica hiperqueratósica. Este conjunto da a la falange distal del dedo un aspecto llamativo, globuloso, que semeja una «maza» o «palillo de tambor». Desde siempre esta enfermedad fue todo un reto terapéutico. Lo ideal sería corregir el déficit inmunitario junto con períodos de tratamiento antifúngico (Kirkpatrick, 1994).

Otro de los agentes etiológicos, a parte de los anteriores ya descritos, a considerar es *Saccharomyces* spp, muy importante debido al aumento de su incidencia en infecciones fúngicas.

S. cerevisiae conocida comúnmente como “levadura de cerveza o de panadería”, es un ascomiceto ubicuo que se encuentra en las plantas, frutas y suelos (Enache-Angoulvant, *et al.*, 2005), y también se usa ampliamente en la industria para la producción de alimentos y bebidas (Skovgaard, *et al.*, 2007), como pan, cerveza y vino (Diezmann, *et al.*, 2009) (Llanos, *et al* 2006).

En los seres humanos esta levadura forma parte de la microbiota habitual de la mucosa del tracto gastrointestinal y respiratorio (Munoz, *et al.*, 2005) (Salonen, *et al.*, 2000). No obstante, en las últimas décadas, la incidencia de infecciones por esta levadura aumentó sobre todo en individuos inmunodeprimidos (Richardson, *et al.*, 2008) (Smith, *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, el uso de antibióticos de amplio espectro, los catéteres intravasculares y los probióticos son algunos de los factores predisponentes más frecuentemente asociados (Llanos, *et al* 2006) (Miceli, *et al.*, 2011) (Richardson, *et al.*, 2008). Esta aparición en el ámbito hospitalario ha hecho que se reconsidere el concepto de *S. cerevisiae* como levadura no patógena y se proponga como una levadura patógena emergente oportunista de baja virulencia.

S. cerevisiae es una levadura que se muestra generalmente en su forma vegetativa como una célula ovoide, aunque bajo ciertas circunstancias de limitación de nutrientes las células se elongan, dando lugar al crecimiento pseudohifal. Las colonias suelen ser blancas y cremosas aunque también se ha descrito que ciertas cepas pueden crecer dando lugar a colonias rugosas, con aspecto irregular (Barnett *et al.*, 2000).

Entre las infecciones superficiales *S. cerevisiae* se ha descrito como causa de vaginitis y de balanitis en sus parejas. La incidencia en la población varía según el

estudio realizado, variando desde un 0,45 % a un 1,06 %. Las vaginitis causadas por *S. cerevisiae* pueden ser tanto sintomáticas como asintomáticas e incluso se considera que esta levadura puede ser la responsable de algunos casos diagnosticados como candidiasis, ya que los síntomas son idénticos (Agatensi *et al.*, 1991).

3.1.2 Tratamiento antifúngico

Tratamiento no farmacológico

Las micosis cutáneas se suelen producir en presencia de factores predisponentes que facilitan el desarrollo y el crecimiento de las colonias de hongos (Hernández-Solís, *et al.*, 2014). Es importante intentar evitar la aparición de estos factores. Estas medidas serán preventivas si nos encontramos en ausencia de síntomas clínicos o coadyuvantes al tratamiento específico cuando hay enfermedad declarada.

Las medidas más importantes que se deben tomar para prevenir las micosis cutáneas son buena higiene personal, uso de prendas de vestir transpirables, sobre todo el calzado y protección de las manos y los pies en actividades laborales y deportivas (Crespo, *et al.*, 2005).

Tratamiento farmacológico

Los antifúngicos que habitualmente se emplean en clínica se usan mediante una aplicación tópica o la administración sistémica, ya por administración oral o por vía parenteral. Sin duda, la vía tópica es la más empleada en tratamientos antifúngicos, dejando los preparados sistémicos para el tratamiento de infecciones graves, invasivas o cuando la respuesta terapéutica a los tópicos es insuficiente (Carrillo-Muñoz, *et al.*, 1999).

Asimismo, los antifúngicos tópicos pueden ser de acción específica o inespecífica (tabla 5). Aunque esta clasificación se sigue utilizando hoy en día, los denominados de acción inespecífica se encuentran prácticamente en desuso.

ESPECÍFICOS					INESPECÍFICOS
Alilaminas	Azoles	Morfolinas	Polienos	Miscelánea	Tintura de yodo
Naftifina	Bifonazol	Amorolfina	Nistatina	Ciclopiroxolamina	Tintura de Castellani
Terbinafina	Butoconazol			Tolnaftato	Pomada de Whitfield
	Clotrimazol				Sol. violeta de genciana
	Eberconazol				Sol. azul de metileno
	Econazol				Sol. permanganato de potasio
	Fenticonazol				Sol. cloruro de aluminio
	Flutrimazol				Sol. acuosa de hipoclorito de sodio
	Ketoconazol				Sulfuro de selenio
	Miconazol				Piritona de cinc
	Oxiconazol				Propilenglicol
	Sertaconazol				
	Tioconazol				

Tabla 5. Antifúngicos tópicos usados en micosis superficiales (Crespo, *et al.*, 2005).

Antifúngicos tópicos inespecíficos:

Son productos astringentes, antisépticos y secantes. Se utilizan como coadyuvantes en las micosis cutáneas con inflamación intensa y/o exudación. Su acción antifúngica es la suma de las acciones desinfectante, antiexudativa y queratolítica. Su principal ventaja es su bajo coste. Su uso se restringe a casos aislados, y los más utilizados son el permanganato potásico a concentraciones entre 1/8.000 y 1/10.000 (es el que tiene mayor actividad antifúngica), el sulfato de cinc a concentraciones de 1/1.000 (tiene utilidad en la dermatitis seborreica) y el sulfato de cobre a concentraciones de 1/1.000 (Crespo, *et al.*, 2005).

Antifúngicos tópicos específicos:

Los antifúngicos tópicos son sustancias químicas cuya acción antimicótica se debe a la interacción sobre diversos componentes del desarrollo y el metabolismo del

hongo, que provocan la inhibición de su crecimiento o su muerte. Actualmente disponemos de una amplia variedad de compuestos tópicos eficaces en el tratamiento de las micosis cutáneas (Stiller, 1993) (Hay, 1990) (Walter, *et al.*, 2011).

I. Polienos.

La nistatina fue el primer antifúngico tópico específico. Se emplea tópicamente para el tratamiento de las infecciones por *Candida* spp. y es clínicamente ineficaz para los dermatofitos. En la actualidad tiene poca utilidad en el tratamiento de las candidiasis cutáneas, sencillamente porque su eficacia se ha visto superada por los azoles y las alilaminas, aunque se sigue usando en las candidiasis oral, esofágica, gastrointestinal y vulvovaginal.

La forma de administración puede ser tópica, en forma de pomadas, cremas o polvos que contienen 100.000 U. por gramo y en la candidiasis oral se utiliza en suspensión, que contiene 100.000 UI/ml, administrando 4-6 ml cuatro veces al día. Es recomendable recordar al paciente la necesidad de realizar enjuagues y después tragar el excedente. Su administración oral puede desencadenar algunos efectos adversos, como diarreas, náuseas o vómitos (Brennan, *et al.*, 1997) (Phillips, *et al.*, 2001) (Ginarte, *et al.*, 2002).

Principio activo	Nombre comercial	Presentación	%	Posología
Nistatina	Mycostatin®	Suspensión oral	100.000 UI/ml	Adultos y niños mayores de 1 año: 250.000 UI– 500.000 UI cada 6-12 h Lactantes: 250.000 UI cada 6 horas.

Tabla 6. Antifúngicos tópicos con nistatina comercializados en España (AEMPS, 2014).

II. Tolnaftato.

Es una sustancia fungicida, activa frente a los dermatofitos y *Malassezia* spp., pero no sobre *Candida* spp.. Por tanto, tiene utilidad en las tineas de piel lampiña (tinea

corporis, cruris y pedis, excepto las infecciones por *T. rubrum*), así como en la pitiriasis versicolor. Es menos eficaz que los derivados imidazólicos y las alilaminas, pero todavía útil (Segurado, *et al.*, 2004). Se trata de un agente en desuso en la práctica clínica habitual.

Principio activo	Nombre comercial	Presentación	%	Posología
Tofnaltato	Solufungin®	Sol. Cutánea	1	no comercializado

Tabla 7. Antifúngicos tópicos con tofnaltato (AEMPS, 2014).

III. Ciclopiroxolamina.

Es un fungistático tópico de amplio espectro del grupo de las piridonas, con buena penetrabilidad en estructuras queratinizadas (palmas, plantas, uñas). Su mecanismo de acción no se relaciona con el de las otras familias de antimicóticos. Actúa alterando el transporte de macromoléculas a través de la membrana celular y el proceso respiratorio celular (Qadripur, 1983). Es activo frente a dermatofitos, *Candida* spp. y *Malassezia* spp. Tiene además una actividad antiinflamatoria secundaria a su capacidad de inhibir la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos (Ginarte, *et al.*, 2002).

Su indicación principal en la actualidad se centra en la dermatitis seborreica (en forma de champús al 1-2 %), o como medicación alternativa, teniendo especial interés en pacientes hipersensibles a los imidazólicos. Ciclopiroxolamina ha demostrado tener una mejor penetración que los derivados imidazólicos en el estrato córneo. Aun así, para el tratamiento tópico de las onicomycosis se prefiere actualmente la solución de tioconazol al 28 % o la amorolfina.

Principio activo	Nombre comercial	Presentación	%	Posología
Ciclopiroxolamina	Ciclochem® Fungowas ® Miclast®	crema, polvo, sol.tópica crema, solución tópica crema, solución tópica	1	2 aplicaciones/ día, durante 7 a 14 días
	Ciclochem® Sebiprox® Ciclopirox Capitec® Ciclopirox Isdin® Ciclopirox Serra®	Champú champú champú champú champú	1,5	2 -3 aplicaciones / semana, durante 4 semanas
	Ciclochem uñas® Miclast uñas® Ciclopirox Isdin® Ciclopirox Serra® Ony-tec®	Barníz barníz barniz barniz barniz	8	Primer mes 1 aplicación / 2 días, Segundo mes 2 aplicaciones / semana; Tercer 1 aplicación / semana

Tabla 8. Antifúngicos tópicos con ciclopiroxolamina comercializados en España (AEMPS, 2014).

IV. Azoles.

Son actualmente los fármacos de elección para casi todo tipo de micosis cutáneas, junto con las alilaminas. Son efectivos frente a dermatofitos, *Candida* spp. y *Malassezia* spp. Los azoles son activos por vía tópica, debido a su lipofilia y su bajo peso molecular, lo que les permite dispersarse en el estrato córneo y penetrar dentro de la pared celular del hongo. Allí es donde desarrollan su mecanismo de acción, la inhibición de la síntesis del ergosterol, un esteroide imprescindible para mantener la permeabilidad y la integridad estructural de la membrana celular del hongo (Lesher, *et al.*, 2003). La síntesis del ergosterol se interrumpe mediante la inhibición de la C-14-alfa-demetilación del lanosterol por la 14 alfa-demetilasa, y determina la acumulación de 14-alfa-metilesteroles (fig. 1). Esta reacción es catalizada por el citocromo P-450 del hongo y como los imidazoles se unen fuertemente al citocromo P-450, y no son específicos, interaccionan con el citocromo P-450 humano, con las consiguientes implicaciones en la toxicidad y las interacciones medicamentosas (Brennan, *et al.*, 1997). Su acción es fugistática aunque a dosis elevadas algunos azoles tienen acción fungicida.

Son los fármacos más utilizados en la práctica clínica diaria y se encuentran disponibles en numerosas formas galénicas (cremas, polvos, geles, soluciones, aerosol, óvulos vaginales, etc.). En la actualidad, disponemos en el mercado de un gran número de derivados imidazólicos de uso tópico, de eficacia similar, por lo que la elección de uno u otro se realizará en función de la agudeza, la extensión y la localización de las lesiones. En general, cuando se administra cualquier derivado imidazólico por vía tópica se recomienda aplicarlo 2 veces al día durante 4 semanas.

Desde que en 1944 se sintetizó el primer azol con actividad antifúngica se han ido describiendo nuevas moléculas azólicas con el fin de mejorar la actividad en el tratamiento de las micosis, destacándose en este último término un nuevo principio activo, el eberconazol. Debemos resaltar que este derivado imidazólico tópico es un fármaco investigado y desarrollado en España (Font, *et al.*, 1995), como también lo fueron en su día flutrimazol y sertaconazol.

Los principales azoles tópicos son: bifonazol, clotrimazol, eberconazol, econazol, flutrimazol, ketoconazol, miconazol, omoconazol, oxiconazol, sertaconazol, terconazol y tioconazol. En nuestro país, ketoconazol es claramente el antifúngico más usado (27 %), seguido de clotrimazol (17 %) y miconazol (17 %) (Alou, *et al.*, 2001). Eberconazol es un nuevo antifúngico con alto potencial terapéutico contra las micosis humanas de localización cutánea o mucosa (Rubin, *et al.*, 2002).

3. PARTE TEÓRICA: Micosis superficiales y vía tópica

Principio activo	Nombre comercial	Presentación	%	Posología
Miconazol (tópico)	Daktarin®	gel oral	2	Adultos 100 mg 4 veces/día
	Fungisdin®	1 cucharada grande 50 mg 1 cucharada pequeña 25 mg		Niños 50 mg 4 aplicación/día Lactantes 25 mg 4 aplicaciones / día, durante 2 a 7 días
	Daktarin tópico® Fungisdin®	crema, polvo aerosol	1	1 – 2 aplicaciones / día, durante 2 a 5 semanas
Miconazol (ginecológico)	Daktarin ginecológico®	crema vaginal	2	1 -2 aplicaciones / día, durante 14 días
Clotrimazol (tópico)	Canesmed® Canespie® Canesten®	Crema crema crema, polvo, sol. Tópica	1	2 aplicaciones / día, durante 2 – 4 semanas
Clotrimazol (ginecológico)	Gine canesmed®	crema	2	
	Gine canesmed®	comp. vaginal 100 mg		
	Gine canesmed®	comp. vaginal 500 mg		
	Gine canesten®	crema	2	
	Gine canesten®	comp. vaginal 100 mg	10	
	Gine canesten®	comp. vaginal 500 mg		
Oxiconazol	Salongo®	Crema	1	1 aplicación / día (noche), durante no menos a 14 días
Fluconazol				no comercializado
Bifonazol	Bifokey® Canespie bifonazol® Levelina® Mycospor®	Crema crema crema, polvo, sol. tópica crema, sol. tópica	2	1 aplicación / día (noche) durante 2 a 4 semanas
Econazol	Ecotam®	Crema	1	2 aplicaciones / día, duración individualizada según criterio médico y cuadro clínico
Ketoconazol (ginecológico)	Ketoisdin® Panfungol®	ovulos vaginal 400 mg		1 ovulo intravaginal/ día durante 3 a 5 días
Tioconazol	Sernax® Tioconazol Abamed® Tioconazol Korhispana® Trosid uñas®	sol. Tópica	28	2 aplicaciones / día durante 6 -12 meses, según microorganismo y localización de la infección.
Sertraconazol (tópico)	Dermofix®	crema, gel, polvo, sol. tópica	2	2 aplicaciones / semana, durante 2 a 4 semanas
Sertraconazol (ginecológico)	Ginedermofix®	crema vaginal comp vaginal 500 mg		1 aplicación / día, durante 7 días 1 solo comp. (noche)
Eberconazol	Ebermac® Ebernet® Ebertop®	Crema crema crema	1	2 aplicaciones/ día, durante 4 semanas
Flutrimazol	Flusporan®	crema, gel, sol. tópica	1	1 aplicación / día, durante 1 – 4 semanas
	Micetal®	crema, polvo, gel, sol. Tópica	1	gel: 3 aplicaciones / semana durante 4 semanas

Tabla 9. Antifúngicos tópicos con azoles comercializados en España (AEMPS, 2014).

V. Alilaminas

Actúan, al igual que los azoles, inhibiendo la síntesis del ergosterol, pero a diferencia de éstos no lo hacen en la demetilación del lanosterol, sino que intervienen a nivel de la epoxidación del escualeno, inhibiendo la escualeno-oxidasa, lo que determina la acumulación intracelular de escualeno y, por consiguiente, la muerte del hongo, por lo que además de fungostáticos las alilaminas son también fungicidas (Leshner, *et al.*, 2003). Otra diferencia con respecto a los derivados azólicos es que las alilaminas no utilizan la vía del citocromo P-450 para realizar su actividad, por lo que no comparten las interacciones medicamentosas de los primeros.

Terbinafina. Hasta el momento es la única alilamina comercializada que actúa tanto por vía tópica como por vía oral. Por vía oral es activa frente a dermatófitos, mohos y hongos dimorfos, mientras que por vía tópica es activa, además, frente a *Candida* y hongos levaduriformes (Weinstein, *et al.*, 2002). Los efectos adversos que presenta son cuantitativamente inferiores por vía tópica (2 %) que por vía oral (11 %): irritación local, eritema, quemazón y sequedad. El tratamiento tópico con terbinafina en crema al 1 % se aplica 1 vez al día durante 1-2 semanas para la tinea corporis, cruris y la candidiasis cutánea, 2 semanas para la pitiriasis versicolor y 2-4 semanas para la tinea de los pies (Balfour, *et al.*, 1992). La eficacia demostrada se acerca al 80 % y, sólo en el caso de las onicomycosis, por vía oral se puede hablar de tasas similares en períodos de 3-12 meses de duración.

Naftifina. Es otro derivado perteneciente al grupo de las alilaminas cuyo uso está restringido a la vía tópica en infecciones provocadas por dermatofitos, *Candida* spp. y *Malassezia* spp. Es un fármaco tópico muy eficaz, con tasas de curación superiores al 80 %, comparables a las de los azoles en las infecciones dermatofíticas. Su principal diferencia se debe a su capacidad antiinflamatoria (Delgado, *et al.*, 2002) (Evans, *et al.*, 1993).

Principio activo	Nombre comercial	Presentación	%	Posología
Terbinafina	Fungeal®	Crema	1	1 aplicación / día, durante 7 días
	Lacomisil®	crema, sol. tópica	1	
	Lamisil®	aerosol, crema sol. tópica	1	

Principio activo	Nombre comercial	Presentación	%	Posología
Naftifina				Anulado

Tabla 10. Antifúngicos tópicos con alilaminas comercializados en España (AEMPS, 2014).

VI. Morfolinas

Amorolfina. Éste a diferencia de los azoles, actúa inhibiendo la síntesis de ergosterol en dos etapas diferentes. Fue el primer derivado morfolínico disponible para uso clínico. Posee una actividad antimicótica potente frente a los hongos con más frecuencia implicados en la etiología de las onicomycosis, tanto dermatófitos como levaduras y mohos. Por este motivo se comercializó, en primer lugar, en España en forma de laca de uñas al 5 %, y se recomendó su aplicación una vez por semana en las uñas afectadas durante varios meses. Esta forma de presentación obvia los inconvenientes para penetrar en la queratina ungueal, que presentaban los fármacos que se utilizaban tradicionalmente en el tratamiento tópico de las onicomycosis, puesto que la laca forma una fina película insoluble en agua, que permanece durante más de una semana, con lo que se consigue un efecto oclusivo que determina un contacto prolongado con el fármaco, y una liberación continuada y sostenida del principio activo, además de un aumento en la concentración de amorolfina que llega al 25 %. Recientemente, se ha comercializado también en forma de crema al 0,25 % y hay que destacar, como ventaja frente a otros antimicóticos tópicos, que sólo es necesaria su aplicación 1 vez al día. En general, su tolerancia es muy buena.

Principio activo	Nombre comercial	Presentación	%	Posología
Amorolfina	Amorolfina Isdin®	Barniz	5	1 -2 aplicaciones / semana durante 6 a 12 meses
	Amorolfina Mylan®	barniz		
	Amorolfina Stada®	barniz		
	Amorolfina Teva®	barniz		
	Locetar uñas®	barniz		
	Odernil uñas®	barniz		
	Locetar ®	crema	0,25	1 aplicación / día, durante 2 a 3 semanas
	Odernil ®	crema		

Tabla 11. Antifúngicos tópicos con amorolfina comercializados en España (AEMPS, 2014).

Por otra parte, en la actualidad, son 4 los fármacos antifúngicos sistémicos que se emplean habitualmente en dermatología (Gupta, 2001) (Pereiro, *et al.*, 2012).

➤ Griseofulvina. Es un antibiótico antifúngico. Fue utilizado por primera vez en 1958 como primer antifúngico oral válido para el tratamiento de las micosis cutáneas. Sólo es activo frente a dermatofitos y no lo es frente a *Candida* spp. ni *Malassezia* (Pityrosporum). La absorción intestinal depende de algunos factores, como la dieta y la posología. La respuesta terapéutica es lenta y el número de resistencias ha ido aumentando en los últimos años. Los efectos secundarios son amplios y muy diversos: náuseas, vómitos, vértigos, insomnio, depresión, mialgias, enuresis, erupciones morbiliformes, fotosensibilización, leucopenia y macrocitosis, entre otros. Su uso está contraindicado en la insuficiencia hepatocelular y la porfiria aguda intermitente, variegata y cutánea tarda. Puede interaccionar con barbitúricos y dicumarínicos. No está recomendado en el embarazo. Actualmente sigue siendo de elección en las tineas del cuero cabelludo, en especial las producidas por *M. canis*, y es el tratamiento de elección en los procesos dermatofíticos pediátricos que requieren tratamiento sistémico, al estar contraindicados los azoles en la edad infantil.

➤ Triazoles. Son fungicidas de amplio espectro que actúan frente a todas las micosis cutáneas. Presentan menos efectos secundarios que los imidazoles sistémicos. El fluconazol y el itraconazol son los principales representantes de este grupo:

- Fluconazol. A diferencia del ketoconazol y del itraconazol, su absorción oral no depende de la acidez gástrica y, por tanto, su administración oral va a ser independiente de la ingesta. Además, es el único azol que puede administrarse por vía parenteral. Es muy útil en las meningitis fúngicas. Su eliminación es por vía renal, con lo cual debe modificarse la dosis según la función renal. Los efectos secundarios no son tan graves como en el ketoconazol. Principalmente puede causar náuseas, vómitos, dolor abdominal o diarreas, e hipertransaminasemias leves.

- Itraconazol. Su absorción oral está influida por la dieta, la acidez gástrica y la dosis. Los efectos secundarios son muy parecidos al fluconazol con la salvedad de que se han descrito muy pocos casos de hepatitis transitorias en relación con el itraconazol. Por sus características farmacocinéticas y espectro de acción, el itraconazol tiene gran utilidad en ciertas micosis cutáneas, sobre todo en las onicomycosis y en las candidiasis vaginales.

➤ Terbinafina (alilaminas). Es un antifúngico con gran eficacia frente a los dermatofitos, pero con poca acción sistémica sobre las candidiasis y la pitiriasis versicolor.

3.1.3 La vía tópica como ruta de administración de fármacos: la piel

La piel es el órgano más extenso y accesible del cuerpo humano, proporciona el 10 % de la masa corporal y tiene una superficie aproximada de 1,8 m². Actúa principalmente como una barrera física, química y biológica que nos separa y protege del medio externo (Madison, 2003). También juega un papel muy importante en la regulación de la temperatura corporal, el mantenimiento del equilibrio hidroeléctrico, la absorción de la radiación ultravioleta y la captación de las señales sensitivas (Elorza, *et al.*, 2012). La piel está constituida por tres capas superpuestas: la epidermis, la dermis y la hipodermis o tejido subcutáneo (El Maghraby, *et al.*, 2008).

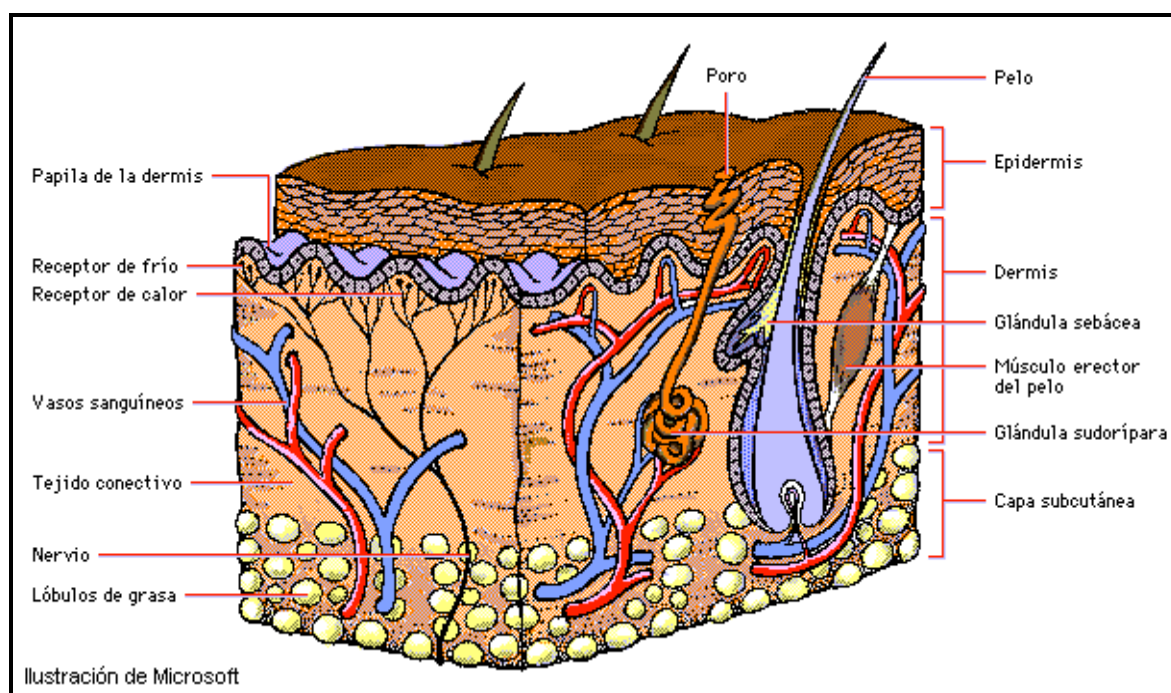


Figura 9. Esquema general de la piel.

Epidermis.

La epidermis tiene un espesor aproximado de 150 µm, y consta de cinco capas: *stratum corneum* (estrato córneo), *stratum lucidum* (estrato lúcido), *stratum granulosum*

(estrato granuloso), *stratum spinosum* (estrato espinoso) y *stratum germinativum* (estrato basal), siendo ésta última, la capa más profunda. A su vez, éstas cinco capas se pueden englobar en otra subdivisión: estrato córneo (*stratum corneum*) y epidermis viable (*stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* y *stratum germinativum*).

- Estrato córneo. Es la capa más delgada y superficial de la piel, y actúa como la principal barrera, evitando la pérdida de agua y fluidos corporales, así como la entrada de agentes externos. Esta capa de la piel se trata de manera más amplia en el siguiente apartado.

- Epidermis viable. Es la capa responsable de la formación de la barrera de la piel. En la capa más profunda, *stratum germinativum* o estrato basal, se produce la mitosis de una serie de células que poco a poco irán emigrando hacia las capas más superficiales de la epidermis, llegando al estrato córneo. Estas células irán madurando a lo largo de las siguientes capas, convirtiéndose en queratinocitos activos. Entre la dermis y la epidermis existe una membrana extracelular llamada lámina basal, constituida por células basales (que se dividen continuamente formando nuevos queratinocitos).

Dermis.

Tiene un espesor de 3000 a 5000 μm , dependiendo de la parte del cuerpo. Es una capa de tejido conectivo que incluye fibras de colágeno y elastina. Está altamente vascularizado y provisto de una buena red de vasos linfáticos. Alberga glándulas sudoríparas y sebáceas, así como los folículos pilosos, y proporciona un buen soporte mecánico, compacto y flexible (Young, *et al.*, 2000) (Fawcett, *et al.*, 2002). Contiene numerosas células, incluyendo fibroblastos y macrófagos.

Hipodermis.

Es la región más interna de la piel humana y está formada por tejido adiposo. Ofrece protección frente a golpes mecánicos, aísla el cuerpo contra el calor externo y el frío, y participa activamente en el metabolismo y almacenamiento de la energía (Baroni, *et al.*, 2012).

Entre los apéndices de la piel podemos distinguir folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas. Se originan en la dermis e hipodermis y perforan el estrato córneo constituyendo zonas de discontinuidad en la integridad del estrato córneo. Son responsables de varias funciones, en las que se incluyen un control térmico y una cubierta de protección en la piel (Schaefer, *et al.*, 1996a).

Folículos pilosos.

Están presentes en toda la superficie de la piel, excepto labios, palmas de las manos y planta del pie. Se forman a partir de una invaginación de la epidermis que llega hasta la hipodermis. Esta invaginación se ensancha en la parte más profunda formando una masa de células matrices que rodean una papila conectiva muy vascularizada. Las células proliferan hacia la superficie diferenciándose en el pelo.

Glándulas sebáceas.

Las glándulas sebáceas producen sebo, que lubrican y protegen la piel. Las glándulas están involucradas en la regulación del pH de la superficie cutánea. La mayoría de ellas están asociadas al folículo piloso, constituyendo la unidad pilosebácea.

Glándulas sudoríparas.

Producen una solución hipotónica conocida como sudor. La evaporación de esta secreción en la superficie cutánea tiene un papel muy importante en la termorregulación.

3.1.4 El estrato córneo y su función barrera

Hasta mediados de los años 1970, el estrato córneo se consideraba un tejido homogéneo y metabólicamente inactivo, análogo a un envoltorio plástico del cuerpo (Proksch, *et al.*, 2008). En los siguientes 40 años, nuestro conocimiento acerca de la formación, estructura, composición y maduración del estrato córneo ha progresado enormemente, pudiendo considerarse en la actualidad una estructura dinámica y activa, ejerciendo una función de sofisticado biosensor que se comunica con la epidermis subyacente para responder ante estímulos externos.

El estrato córneo es la capa más delgada y superficial de la piel, y actúa como la principal barrera, evitando la pérdida de agua y fluidos corporales, así como la entrada de agentes externos.

El estrato córneo es el producto final de la diferenciación de los queratinocitos (McAleer, *et al.*, 2013). En las últimas fases de su diferenciación, estas células experimentan cambios en su estructura que provocan su transformación en corneocitos o células escamosas planas anucleadas (Armegot-Carbo, *et al.*, 2014). Los corneocitos están unidos entre sí mediante corneodesmosomas y recubiertos por la llamada envoltura cornificada. La envoltura cornificada es una envoltura celular constituida por una porción protéica adyacente al corneocito y otra lipídica en íntima relación con la matriz extracelular. Esta envoltura proporciona resistencia mecánica y química (McAleer, *et al.*, 2013). La matriz extracelular es hidrófoba y rica en lípidos que se disponen en bicapas laminares (Proksch, *et al.*, 2008).

Esta organización del estrato córneo es considerada un muro de ladrillos, donde los corneocitos o queratinocitos diferenciados son los ladrillos, y el cemento o mortero la matriz lipídica extracelular (Nemes, *et al.*, 1999) (Conejo-Mir, *et al.*, 2011). Es el denominado “modelo de los ladrillos y mortero” o “ladrillos y cemento” (Armegot-Carbó, 2014).

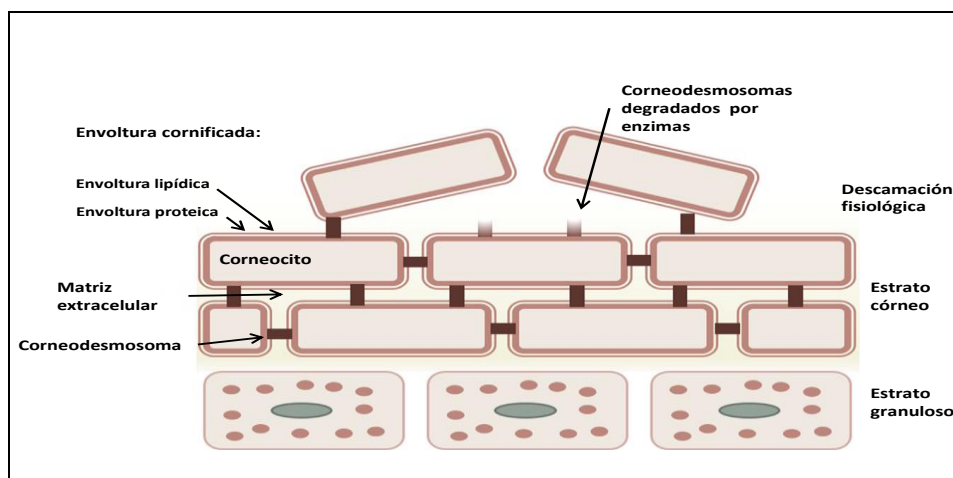


Figura 10. Estructura del estrato córneo (Armengot-Carbó. 2014).

El estrato córneo posee un 15 % de agua, un 70 % de proteínas y un 15 % de lípidos aproximadamente, lo que le confiere unas propiedades diferentes de las de la epidermis, dermis u otros tejidos viables. Presenta un pH en torno a 5,5 (Schaefer, *et al.*, 1996b) (Sznitowska, *et al.*, 2001), y se ha demostrado la capacidad tamponante que posee, lo cual influye en el estado de ionización de compuestos del estrato córneo y en la absorción percutánea de xenobióticos con carácter ácido o base débil (Schaefer, *et al.*, 1996b).

La matriz lipídica constituye aproximadamente el 20 % del volumen del estrato córneo y en torno al 15 % del peso seco. Respecto a su composición, la mayoría de los lípidos presentes en él son ceramidas (aproximadamente el 50 % del peso), ácidos grasos (10-20 %), colesterol (25 %) y alrededor de un 5 % de otros tipos de lípidos, de los cuales el más importante es el sulfato de colesterol (Madison, 2003). Los principales ácidos grasos, fundamentalmente insaturados, presentan longitudes de cadena muy largas (C_{20} y C_{36}). Esto, junto que las cadenas tan largas de las ceramidas, se ha postulado como la principal responsable de las propiedades físicas tan peculiares de la bicapa lipídica córnea entre las membranas biológicas.

La mayoría de los lípidos del estrato córneo se forman a partir del contenido de los cuerpos lamelares formados en los queratinocitos de las capas espinosa y granulosa de la epidermis. En la interfase entre la capa granulosa y la capa córnea, los

fosfol3pidos, esfingol3pidos y otros constituyentes de la membrana plasm3tica son fragmentados enzim3ticamente a medida que entran en la capa c3rnea, para producir 3cidos grasos libres y ceramidas. Estos componentes se fusionan posteriormente para formar las bicapas lamelares continuas caracter3sticas del estrato c3rneo. Se estima que la piel sintetiza aproximadamente 100-150 mg de l3pidos al d3a para reemplazar las p3rdidas normales por descamaci3n (Harding, 2004).

Por otra parte, los corneocitos se pueden considerar como un complejo insoluble prot3ico, compuesto fundamentalmente por una matriz macrofibrilar de queratina altamente organizada. La queratina se estabiliza mediante filamentos inter e intraqueratina unidos a trav3s de puentes disulfuro, y est3 encapsulada mediante una coraza prot3ica denominada envoltura celular cornificada. Esta envoltura es una estructura de unos 15-20 nm de espesor, que consta de una capa de 15 nm de prote3nas estructurales, y otra de 5 nm de l3pidos especializados (Harding, 2004). Esta monocapa lip3dica caracterizada por ceramidas de cadena larga unidas covalentemente al exterior de la envoltura, crea una interfase hidrof3bica entre la superficie hidrof3lica de la envoltura y la lamela lip3dica, muy hidrof3bica. Esta capa ayuda, junto los l3pidos intercelulares, a mantener la funci3n de barrera al agua.

Para que la capa c3rnea sea una estructura compacta, estas capas superpuestas de corneocitos tienen que estar firmemente unidas entre s3 mediante unas estructuras de uni3n, denominadas corneodesmosomas. Se trata de complejos macromoleculares glucoprot3icos. Estas glucoprote3nas cruzan la envoltura celular cornificada hasta el espacio intercelular lip3dico dispuesto entre los corneocitos, aportando cohesi3n mediante la uni3n a prote3nas de las c3lulas adyacentes (Rawlings, 2003). Otras prote3nas especializadas, y en particular la corneodesmosina (Lundstrom, *et al.*, 1994), desempeñan un papel esencial en la estructura de los corneodesmosomas en los procesos de cohesi3n y de descamaci3n.

3.1.5 Rutas de penetración de xenobióticos a través de la piel

La epidermis se diferencia de las mucosas por el espesor del epitelio y fundamentalmente por el estrato córneo, lo cual hace más lenta la penetración de los compuestos, al ser mayor el espesor a atravesar así como por la barrera que constituye el estrato córneo.

Las rutas de penetración a través de la piel se dividen de modo general en dos tipos (Barry, 2001) (Hadgraft, 2001) (Barry, 2002):

- Ruta transapendicular: a través de los anexos cutáneos.
- Ruta transepidérmica: a través de la epidermis; dentro de esta ruta se distinguen las rutas intercelular e intracelular.

Es importante el hecho de que las distintas rutas no son excluyentes entre sí, y dependen de las características físico-químicas de cada compuesto (Schaefer, *et al.*, 1996b) (El Maghraby, *et al.*, 2008). Es posible que la mayoría de moléculas penetren en el estrato córneo por una combinación de vías, aunque la ruta transepidérmica intercelular parece ser la vía difusional predominante para la mayoría de moléculas que atraviesan la capa córnea. Los agentes activos no polares penetran el estrato córneo por la ruta intercelular mientras que los polares lo hacen por la ruta intracelular (transcelular) (Elorza, *et al.*, 2012).

Ruta transapendicular

Es la ruta de penetración a través de los anexos cutáneos, teniendo especial importancia la unidad pilosebácea (folículo piloso y glándula sebácea asociada), ya que es el anexo cutáneo más importante en términos de área superficial, no obstante el área ocupada por los anexos no es muy elevada, en torno al 1 % de la superficie total de la piel, lo que hace que la ruta transepidérmica sea la más importante.

En la administración tópica la unidad pilosebácea juega un doble papel. Por una parte, puede ser la vía para conseguir una administración sistémica del compuesto, dado

la gran cantidad de capilares asociados al folículo. Por otra parte, puede conseguirse un efecto local como órgano diana del principio activo en desórdenes dermatológicos asociados a este anexo cutáneo.

El ambiente lipofílico que se crea con la secreción de sebo a través de la glándula sebácea puede influir en la absorción de los compuestos.

Se considera que la vía transapendicular puede tener gran importancia para la absorción de compuestos con baja absorción por vía transepidérmica y en las primeras fases de la absorción cuando aún no se ha establecido el estado continuo a través del dominio del lípido intercelular.

Ruta transepidérmica

La ruta transepidérmica a su vez se divide en 2 rutas diferentes:

Ruta intercelular

Supone que el compuesto atraviesa el espacio lipídico que une las células del estrato córneo. El estrato córneo presenta una composición de lípidos intercelulares excepcional, así como una disposición de estos lípidos que lo diferencian del resto de membranas biológicas, lo cual orienta hacia la idea de que esta ruta es el paso limitante de los compuestos. Se trata de un camino tortuoso, habiéndose calculado que el camino de difusión del agua al atravesar el estrato córneo por esta vía es aproximadamente 50 veces el espesor del estrato córneo (Schaefer, *et al.*, 1996b).

Ruta intracelular

Esta ruta supone atravesar las membranas córneas y los lípidos que impregnan la queratina, lo que implica el paso de xenobióticos a través de los corneocitos.

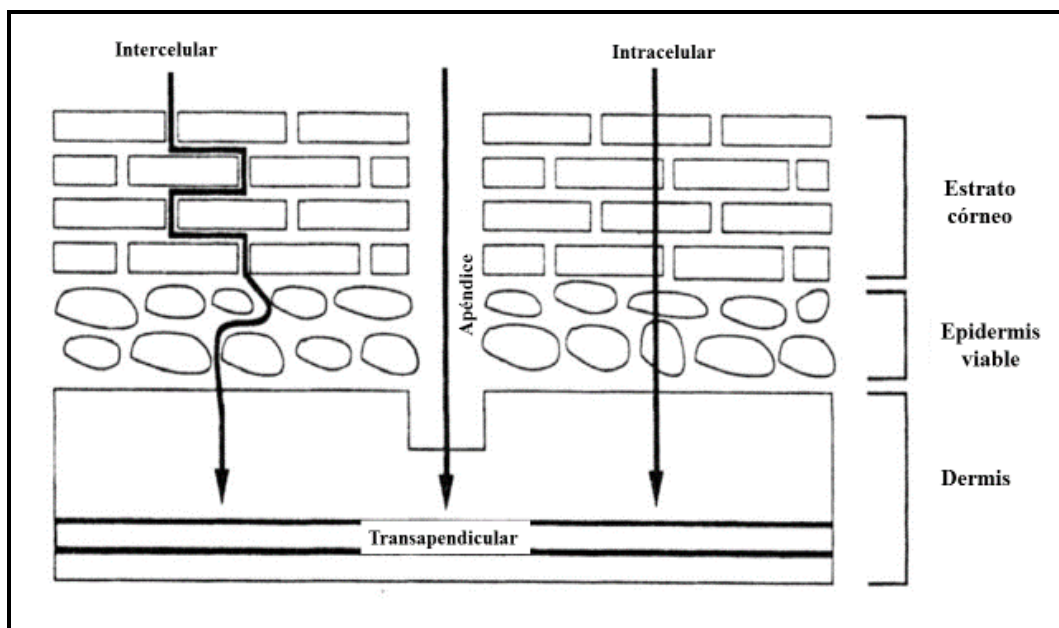


Figura 11. Rutas de penetración (Singh, *et al.*, 2013).

Existe un elevado número de principios activos que no poseen la capacidad de atravesar la piel en una magnitud suficiente para lograr una absorción percutánea eficiente, y por lo tanto, alcanzar los niveles terapéuticos requeridos. Una de las estrategias para solucionar es la utilización de los llamados promotores de penetración. Estos promotores pueden ser físicos o químicos. Favorecen el paso del fármaco en el estrato córneo y su posterior paso a través de la piel para en determinadas ocasiones alcanzar los vasos sanguíneos y linfáticos, desorganizando la estructura del estrato córneo.

Las propiedades óptimas de un promotor de penetración serían: no poseer ninguna actividad farmacológica y ser químicamente inerte, no ser tóxico, estable ni irritante, ni alergénico, debe ser compatible con los fármacos y excipientes de la formulación, la acción debe ser inmediata, y el efecto predecible y adecuado, tras retirar el material de la piel debe recuperar de forma inmediata y completa su propiedad de barrera, el promotor no debe provocar pérdida de líquido, electrolitos ni otras sustancias endémicas de la piel.

Los promotores de penetración se pueden clasificar según su mecanismo de acción, pudiendo actuar de una o más formas.

- Acción sobre los lípidos. El promotor actúa sobre la bicapa lipídica altamente estructurada, rompiéndola o haciéndola más permeable a las moléculas del fármaco (azona, terpenos, ácidos grasos, dimetilsulfóxido y alcoholes).
- Acción sobre las proteínas. En este caso los agentes con actividad superficial interaccionan con la queratina de los corneocitos abriendo la densa estructura protéica, haciéndola más permeable y aumentando el coeficiente de difusión de los principios activos.
- Acción sobre el coeficiente de reparto. Muchos solventes penetran en el estrato córneo modificando las propiedades de solubilidad de esta capa de la piel, al alterar el ambiente químico, y de este modo, aumentando el reparto de una segunda molécula dentro de la capa córnea. Esta molécula podría ser un principio activo, un copromotor o un cosolvente.

3.2 Diseño y elaboración de formulaciones tópicas

3.2.1 Aspectos generales

Las formas farmacéuticas tópicas se pueden clasificar en tres grupos:

- Las formas líquidas que son bastante frecuentes (soluciones, suspensiones o emulsiones líquidas).
- Las formas sólidas, que también se suelen utilizar (polvos suavizantes y lubricantes y las barras o lapiceros que contienen sustancias medicamentosas).
- Las formas semisólidas que constituyen el grupo más amplio dentro de las formulaciones aplicadas sobre piel y mucosas (Vila-Jato, J.L., 2001), y que detallaremos a continuación.

Según la Real Farmacopea Española, las preparaciones semisólidas para aplicación cutánea están destinadas a la administración local o transdérmica de principios activos, o tienen una acción emoliente o protectora. Son de aspecto homogéneo.

Las preparaciones semisólidas para aplicación cutánea están constituidas por una base, simple o compuesta, en la cual habitualmente están disueltos o dispersados uno o más principios activos. La composición de esta base puede tener influencia sobre la actividad de la preparación.

Los excipientes utilizados en la base pueden ser sustancias de origen natural o sintético y constituir un sistema de una o varias fases. De acuerdo con la naturaleza de la base, la preparación puede tener propiedades hidrófilas o hidrófobas; puede contener también otros excipientes adecuados, como conservantes antimicrobianos, antioxidantes, estabilizantes, emulsionantes, espesantes y agentes potenciadores de la penetración.

Se pueden distinguir varios tipos de preparaciones semisólidas para aplicación cutánea: pomadas, cremas, geles, pastas, cataplasmas, apósitos adhesivos medicamentosos, y parches cutáneos

Según su estructura, las pomadas, cremas y geles presentan normalmente un comportamiento viscoelástico y propiedades de fluidos no newtonianos, por ejemplo, de tipo plástico, pseudoplástico o tixotrópico, a altas velocidades de cizalladura. Las pastas presentan frecuentemente propiedades de dilatación (RFE, 2015).

Pomadas

Las pomadas constan de una base en una sola fase en la que pueden estar dispersadas sustancias sólidas o líquidas.

- Pomadas hidrófobas

Las pomadas hidrófobas sólo pueden absorber pequeñas cantidades de agua. Las bases que se emplean con más frecuencia en su formulación son las parafinas sólidas, las parafinas líquidas y líquidas ligeras, los aceites vegetales, las grasas animales, los glicéridos sintéticos, las ceras y los polialquilsiloxanos líquidos.

- Pomadas que emulsionan agua

Estas pomadas pueden absorber mayores cantidades de agua produciendo después de su homogeneización emulsiones del tipo agua en aceite o aceite en agua, dependiendo de la naturaleza de los emulsionantes: pueden usarse para este fin agentes emulsionantes del tipo agua en aceite, tales como alcoholes de lanolina, ésteres de sorbitán, monoglicéridos y alcoholes grasos, o agentes emulsionantes del tipo aceite en agua, tales como alcoholes grasos sulfatados, polisorbatos, éter cetostearylílico del macrogol o ésteres de ácidos grasos con macrogles. Las bases utilizadas son las de las pomadas hidrófobas.

- Pomadas hidrófilas

Las pomadas hidrófilas son preparaciones cuyas bases son miscibles con agua. Las bases están constituidas generalmente por mezclas de macrogles

(polietilenglicoles) líquidos y sólidos. Pueden contener cantidades adecuadas de agua (RFE, 2015).

Características de las pomadas.

➤ Aplicación tópica. Son formas farmacéuticas destinadas a la aplicación sobre piel o mucosas. La piel no es una buena superficie de absorción. Por ello, estos preparados se utilizan habitualmente cuando se precisa que el medicamento actúe *in situ* –acción local-, si bien en algunos casos se busca también la penetración de los principios activos y su absorción hasta alcanzar el torrente sanguíneo para obtener una acción sistémica.

Según su capacidad de penetración las clasificamos en:

Epidérmicas. Tienen poca capacidad de penetración y actúan en la superficie de la piel.

Endodérmicas. Presentan una capacidad de penetración media por lo que el medicamento actúa en las capas internas de la piel.

Diadérmicas. Poseen una gran capacidad de penetración, de manera que el fármaco alcanza los capilares y se distribuye por el organismo.

➤ Capacidad cubriente. En general, presentan una buena capacidad cubriente. Cuando se extienden sobre la piel forman una barrera lipofílica que la protege del medio externo (efecto barrera) y que en muchos casos tiene un elevado carácter oclusivo.

La oclusividad es la propiedad que tienen algunos excipientes de impedir la pérdida de vapor de agua y calor a través de la piel. Esto facilita la penetración al menos de los principios activos hidrosolubles por los mecanismos que se esquematizan en la siguiente Figura 12 (Arco, 2004).

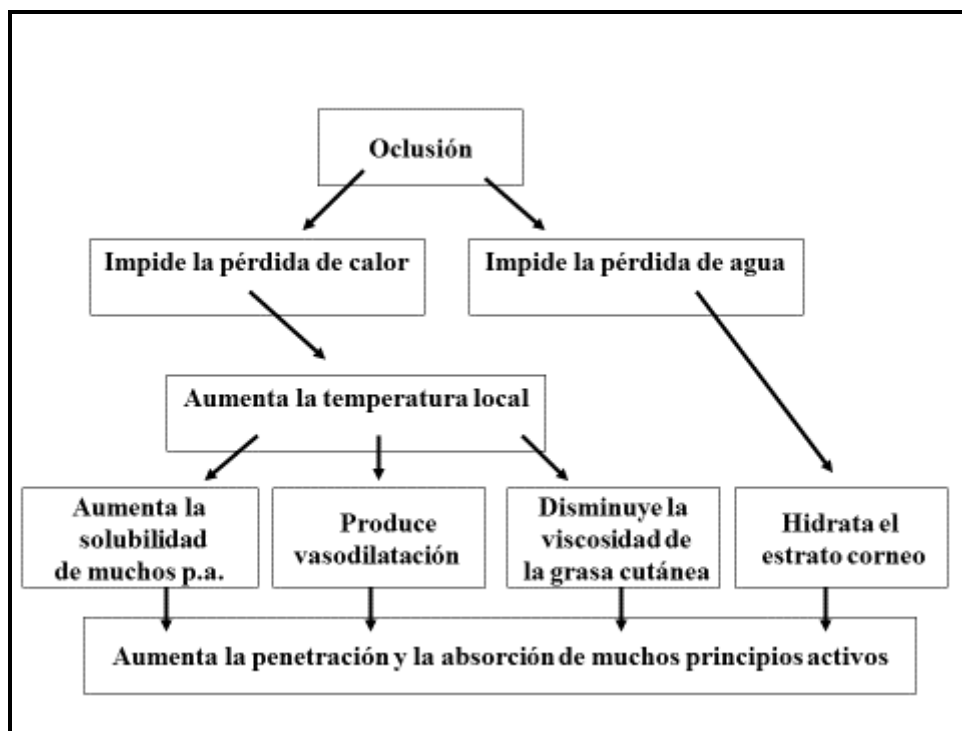


Figura 12. Esquema de los diferentes mecanismo mediante los cuales la oclusión provoca un incremento en la permeabilidad de la piel (Arco, 2004).

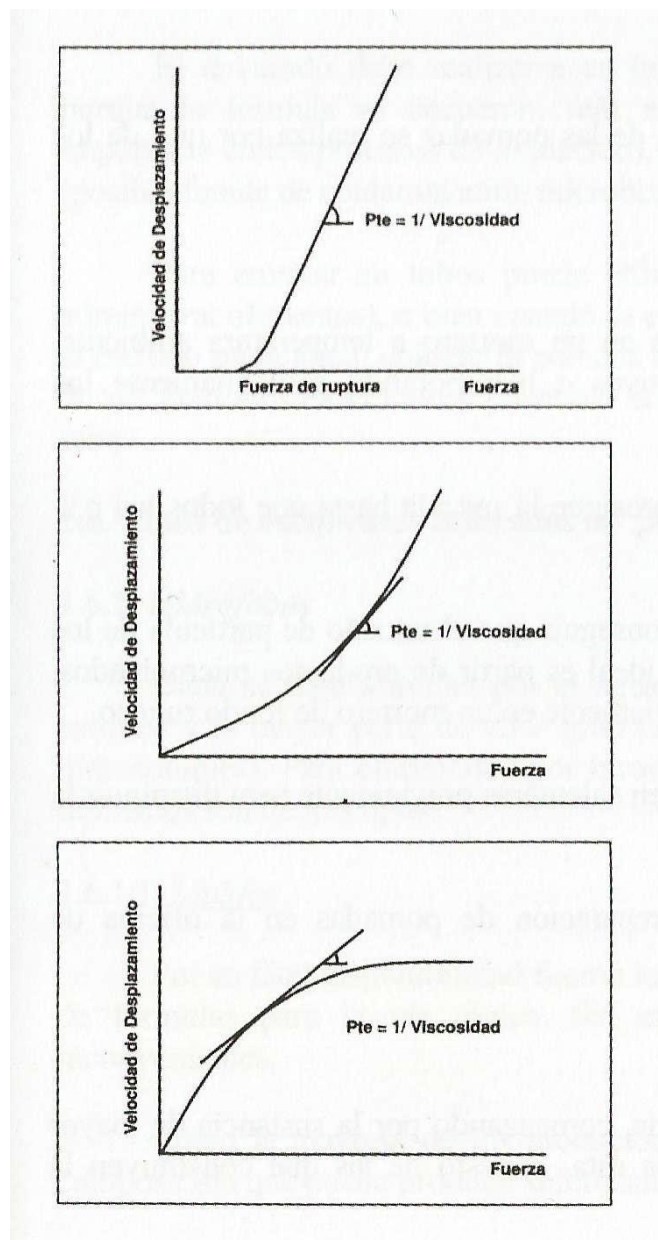
Los aceites vegetales tienen menor capacidad cubriente que otras grasas y además menos carácter oclusivo. No obstante, teniendo en cuenta que hoy en día casi todas las pomadas se fabrican mayoritariamente con vaselinas podemos considerar que la capacidad cubriente y la oclusividad son características comunes a todas las pomadas.

Es importante no confundir el concepto de efecto barrera (protección de la piel frente al agua y otros agentes) con el de oclusividad. Aunque los excipientes oclusivos también poseen efecto barrera, existen excipientes que son capaces de formar buenas barreras protectoras pero no son oclusivos (por ejemplo los aceites de silicona).

➤ **Aspecto graso.** Al estar constituidas por sustancias oleosas, cuando se aplican sobre la piel confieren a ésta un aspecto graso y brillante. Además, pueden manchar las ropas que entren en contacto con ellas, sobre todo las bases grasas o las emulsiones A/O.

➤ **Características reológicas.** Presentan un flujo plástico o pseudoplástico. Algunas no fluyen hasta que la fuerza que se ejerce para extenderlas alcanza un

determinado valor conocido como fuerza umbral o “Yield Stress” (ver gráficas). Esto puede ser una ventaja a la hora del envasado y la utilización de las mismas.



Flujo plástico: La viscosidad es constante a partir de un valor dado de la fuerza de deformación aplicada.

Flujo pseudoplástico: La viscosidad disminuye según se va aumentando la fuerza de deformación aplicada.

Flujo dilatante: La viscosidad aumenta al incrementarse la fuerza de deformación, ya que los sólidos presentes en la formulación sufren una deficiente lubricación por el líquido circundante y este fluye con dificultad al intentar extender el producto.

Figura 13. Viscosidad (Arco, 2004).

Cremas

Las cremas son preparaciones multifásicas tipo emulsión constituidas por una fase lipófila y una fase acuosa.

- Cremas lipófilas

En las cremas lipófilas la fase continua es la fase lipófila. Estas preparaciones contienen agentes emulsionantes del tipo agua en aceite, tales como alcoholes de lanolina, ésteres de sorbitán y monoglicéridos.

- Cremas hidrófilas

Las cremas hidrófilas tienen como fase continua la fase acuosa. Estas preparaciones contienen agentes emulsionantes del tipo aceite en agua, tales como jabones de sodio o de trolamina, alcoholes grasos sulfatados, polisorbatos y ésteres de ácidos grasos y alcoholes grasos polioxietilados combinados, en caso necesario, con agentes emulsionantes del tipo agua en aceite.

Geles

Los geles están formados por líquidos gelificados con la ayuda de agentes gelificantes apropiados.

- Geles lipófilos

Los geles lipófilos (oleogeles) son preparaciones de fase líquida grasa cuyas bases están constituidas habitualmente por parafina líquida con polietileno o aceites grasos gelificados con sílice coloidal o con jabones de aluminio o zinc.

- Geles hidrófilos

Los geles hidrófilos (hidrogeles) son preparaciones cuyas bases están constituidas habitualmente por agua, glicerol o propilenglicol, gelificados con agentes gelificantes adecuados, tales como poloxámeros, almidón, derivados de la celulosa, carbómeros y silicatos de magnesio y aluminio.

Pastas

Las pastas son preparaciones semisólidas para aplicación cutánea que contienen elevadas proporciones de sólidos finamente dispersados en la base.

Cataplasmas

Las cataplasmas consisten en una base hidrófila que retiene el calor, en la que se encuentran dispersados los principios activos sólidos o líquidos. Normalmente se extienden en una capa gruesa sobre un apósito adecuado y se calientan antes de su aplicación sobre la piel.

Apósitos adhesivos medicamentosos

Los apósitos adhesivos medicamentosos son preparaciones flexibles que contienen uno o más principios activos. Están destinados a ser aplicados sobre la piel y diseñados para mantener un estrecho contacto entre la piel y el o los principios activos, de tal modo que éstos puedan ser absorbidos lentamente o actuar como agentes protectores o queratolíticos.

Los apósitos adhesivos medicamentosos constan de una base adhesiva, que puede ser coloreada, que contiene uno o más principios activos, extendida como una capa uniforme sobre un soporte apropiado de material natural o sintético. Los apósitos adhesivos medicamentosos no provocan irritación ni sensibilización de la piel. La capa adhesiva está cubierta por una banda protectora adecuada, que se retira antes de aplicar el apósito sobre la piel. Cuando se retira, la banda protectora no provoca la separación de la preparación del soporte.

Los apósitos adhesivos medicamentosos se presentan en una gama de tamaños que permita su uso directo o bien en forma de láminas de mayor tamaño que deben cortarse antes de su utilización. Los apósitos adhesivos medicamentosos se adhieren firmemente a la piel mediante una presión suave y pueden ser retirados sin provocar ningún daño apreciable en la piel ni la separación de la preparación del soporte.

Parches cutáneos

Los parches cutáneos son preparaciones flexibles que contienen uno o más principios activos. Están destinados a ser aplicados sobre la piel y diseñados para mantener un estrecho contacto entre la piel y el principio o principios activos de tal modo que éstos puedan actuar localmente.

Los parches cutáneos consisten en una base adhesiva, que puede ser coloreada, que contiene uno o más principios activos, extendida como una capa uniforme sobre un soporte apropiado de material natural o sintético. La base adhesiva no provoca irritación ni sensibilización de la piel. La capa adhesiva está cubierta por una banda protectora adecuada, que se retira antes de aplicar el parche sobre la piel. Cuando se retira, la banda protectora no provoca la separación de la preparación del soporte.

Los parches cutáneos se presentan en una gama de tamaños adaptados a su uso. Se adhieren firmemente a la piel mediante una presión suave y pueden ser retirados sin provocar ningún daño apreciable en la piel ni la separación de la preparación del soporte (RFE, 2015).

Por otro lado, el principal papel del excipiente es servir de soporte al principio activo que se desea aplicar sobre la piel, aunque el excipiente podrá influir en la penetración del principio activo hacia lugares más o menos profundos situados por debajo de la zona de aplicación y contribuir de este modo en la eficacia del preparado.

En algunos casos (pomadas protectoras) el excipiente puede influir en la capacidad de protección final de la pomada frente a diversos agentes externos o incluso desprovisto de medicamentos propiamente dichos, puede utilizarse como protector. En otros casos, el excipiente contribuye a mantener las características físicas y químicas de la piel normal (grado de humedad, pH), mejorando así sus mecanismos de defensa.

Las características que de modo general deben reunir los excipientes de pomadas pueden resumirse en las siguientes:

- Deben ser bien tolerados y no manifestar acciones que los inhabiliten (irritantes, sensibilizantes).
- Tienen que ser inertes frente al principio activo que incorporan (compatibilidad física y química), así como frente al material de acondicionamiento.

- Han de ser lo suficientemente estables frente a los factores ambientales como para garantizar su conservación.
- Deben presentar una consistencia conveniente para que su extensión sobre la piel o las cavidades mucosas se realice con facilidad y, además, puedan dispensarse en tubos.
- En determinados casos (pomadas oftálmicas) se requiere que sean esterilizables.
- Deben ceder adecuadamente el principio activo que incorporan.
- En la medida de lo posible, tiene que presentar caracteres organolépticos no desagradables (Vila-Jato, J.L., 2001).

3.2.2 Variantes de formulación de pomadas hidrófobas

El común denominador en las pomadas hidrófobas es que en su formulación en ningún caso se incluye la presencia de agua.

Los excipientes en una pomada hidrófoba son vehículos de carácter graso o lipófilo, que pueden utilizarse aislados o en mezclas. Dada su baja afinidad por el agua poseen poca capacidad de penetración por sí mismos y la mayor parte de ellos gran poder oclusivo (favorecen la penetración de principios activos hidrosolubles). Para eliminarlos por lavado es necesario el uso de detergentes. Los más utilizados son de tres tipos:

Lípidos

Por su fácil disponibilidad fueron los primeros agentes empleados en la preparación de fórmulas para la vía tópica. Sin embargo, han caído en desuso debido a sus inconvenientes. Como la mayoría de los productos naturales existe una cierta variabilidad en su composición que puede producir diferencias apreciables entre los distintos lotes. Además, son excipientes sensibles a la degradación del calor, oxidaciones, enranciamientos, etc. Dentro de este grupo se incluyen las grasas animales, aceites vegetales, ésteres y lípidos sencillos.

Hidrocarburos

Hace más de un siglo que se introdujeron las mezclas de hidrocarburos saturados derivados del petróleo, que presentan la gran ventaja de su inercia química (son muy estables y muy poco alergénicos).

La más utilizada es la vaselina filante o petrolato blanco, también denominada vaselina blanca. Es una mezcla semisólida de hidrocarburos lineales de la serie C_nH_{2n+2} obtenidos del petróleo, altamente refinada, y completamente o casi decolorada. Esta estructura es la que le confiere sus propiedades características. Así, no posee un punto de fusión fijo, siendo también variables sus propiedades reológicas, consistencia, viscosidad y densidad.

Existen también las vaselinas líquidas, también llamadas parafinas líquidas que se emplean para disminuir la viscosidad de las pomadas y también para incorporar muchos principios activos elaborando una pasta.

También se dispone de la parafina sólida, que suele emplearse para aumentar la viscosidad de las pomadas.

Todas las vaselinas son altamente oclusivas y a menudo se emplean como emolientes, sólo para mantener una textura suave de la piel y favorecer el correcto desarrollo y formación del estrato córneo.

Añadiendo a vaselinas líquidas un 55 % de polietileno (PM 21000 Da) se obtiene una sustancia gelificada llamada Plastibase®. Por sus propiedades es sensiblemente igual a la vaselina, pero a diferencia de esta última su consistencia permanece prácticamente invariable en el intervalo de temperaturas entre -15 °C y 60 °C y no se modifica apreciablemente cuando se le adiciona una proporción elevada de sólidos. Su manipulación es, en consecuencia, más cómoda, particularmente en la producción a gran escala. En lo que se refiere a la liberación de medicamentos, parece que se comporta de manera más favorable que la vaselina (Vila-Jato, J.L., 2001).

Otro hidrocarburo de interés es el perhidroescualeno o escualeno que se obtiene por hidrogenación del escualeno de origen natural. Dado que el escualeno es un componente natural de la piel, este producto tiene una gran dermatocompatibilidad.

Dimeticonas o poli-dimetilsiloxanos

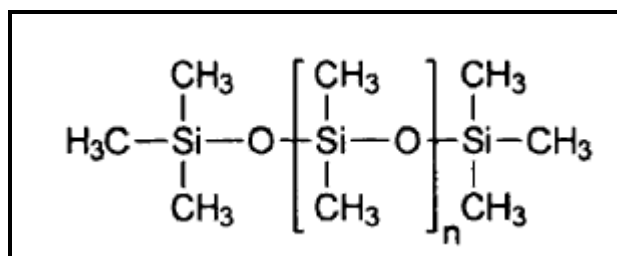


Figura 14. Estructura química de dimeticonas.

Se presenta en forma de líquido claro, incoloro, disponible en varias viscosidades. Éstas se utilizan en cosmética y en formulación farmacéutica, en una concentración entre 10 y 30 % en el caso de cremas (A/O), lociones y ungüentos, y entre 0,5 y 5,0 % para emulsiones O/A. Miscible con etilacetato, metiletilcetona, aceite mineral, éter, cloroformo y tolueno; soluble en miristato de isopropilo; muy ligeramente soluble en etanol (95 %); prácticamente insoluble en glicerina, propilenglicol y agua (Rowe, *et al.*, 2009).

3.2.3 Descripción general de los componentes utilizados en el presente estudio

3.2.3.1 Principio activo: Anfotericina B

Descripción

La anfotericina B (AmB) se encuentra descrita en la Real Farmacopea Española como una mezcla de antifúngicos poliénicos producida por el crecimiento de determinadas cepas de *Streptomyces nodosus* u obtenida de cualquier otro modo (RFE, 2015).

Es un fármaco perteneciente a los grupos J02A (antimicóticos sistémicos) y A01A2 (antifúngicos bucales y gastrointestinales) (Villa, 2014).

Este microorganismo fue descubierto en 1955 en el delta del río Orinoco en Tembladora (Venezuela) por W. Gold *et al.*, quienes evaluaron por primera vez las propiedades biológicas de la AmB (Lemke, *et al.*, 2005) (Donovick, *et al.*, 1955). Sin embargo, la síntesis química de la molécula completa fue descrita por Nicolaou *et al.*, en 1987 (Nicolaou, *et al.*, 1987). En la actualidad la síntesis de la AmB se lleva a cabo mediante producción biotecnológica, debido a la complejidad estructural de la molécula (con múltiples estereocentros, anillo macrocíclico y enlace beta-glicosídico) que provoca altos costes y bajo rendimiento (Lemke, *et al.*, 2005).

Características físico-químicas de la AmB

Estructura de la AmB

La AmB es el ácido (1R,3S,5R,6R,9R,11R,15S,16R,17R,18S,19E, 21E,23E,25E,27E,29E,31E,33R,35S,36R,37S)-33-[(3-amino-3,6-didesoxi-β-D-manopiranosil)oxi]-1,3,5,6,9,11,17,37-octahidroxi-15,16,18-trimetil-13-oxo-14,39-dioxabicyclo[33.3.1]nonatriaconta-19,21,23,25,27,29,31-heptaeno-36-carboxílico (RFE, 2015).

Su fórmula molecular es $C_{47}H_{73}NO_{17}$ y su peso es 924,09 g/mol (Gennaro, 2003).

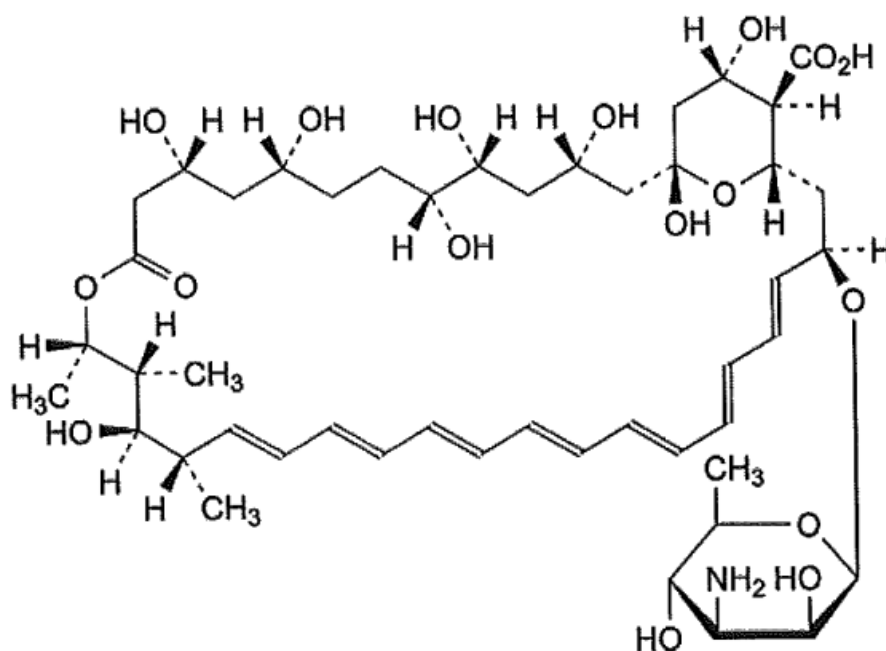


Figura 15. Estructura química de la AmB (RFE, 2015).

Su estructura química se caracteriza por presentar un anillo macrocíclico con un grupo lactónico interno y un grupo cromóforo constituido por siete dobles enlaces conjugados que da lugar a su espectro característico en la zona del ultravioleta/visible. La AmB es una molécula anfifílica (o también denominado anfipática) caracterizada por presentar una cara lipofílica (hidrófoba) constituida por la cadena heptaénica que alarga la estructura del anillo macrocíclico y da rigidez a la molécula, y por una cara hidrofílica (polar) compuesta por siete grupos hidroxilo y un grupo éster. Además presenta un anillo interno tipo hemiacetal, el cual se encuentra en equilibrio con la forma cetónica abierta cuando la molécula está en solución (Asher, 1977).

La AmB es una molécula anfótera como su nombre indica, de manera que es capaz de comportarse tanto como ácido o como base en función del pH del medio en la que se encuentre (Asher, 1977). En el anillo macrocíclico presenta un ácido carboxílico y una cadena lateral de micosamina (aminodesoxihexosa) con un grupo amino primario. Tanto el grupo amino como el grupo carboxílico están ionizados a pH fisiológico, con

valores de pKa de 10,0 y de 5,5 respectivamente (Moffat, *et al.*, 1986). Ambos grupos juegan un papel clave en la actividad biológica que tiene la AmB (Volmer, *et al.*, 2010).

Aspecto y solubilidad

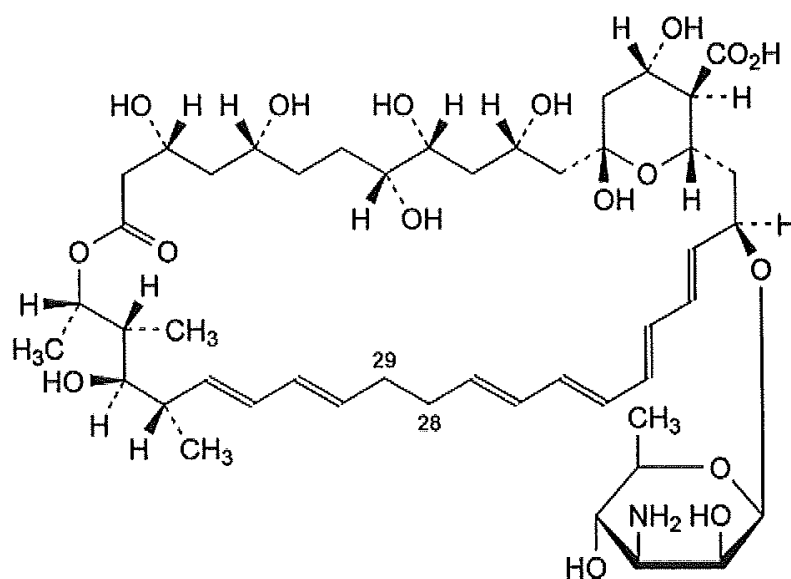
Se presenta como un polvo amarillo o anaranjado, higroscópico (RFE, 2015).

Como consecuencia de su naturaleza anfifílica y zwitteriónica y la distribución asimétrica de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, la AmB es una molécula muy poco soluble no solamente en solventes acuosos, sino también en la mayoría de los disolventes orgánicos. La AmB en agua a pH fisiológico (pH 6 – 7) presenta una solubilidad inferior a 0,001 mg/ml (Torrado, *et al.*, 2007), pero su solubilidad se incrementa notablemente a pH extremos (por debajo de 2 o por encima de 11). Sin embargo, en estas condiciones extremas de pH la AmB no es estable (Windholz, *et al.*, 1983) (Bennett, 1995). En condiciones ácidas o alcalinas, la AmB puede formar sales. Estos compuestos presentan una mejor solubilidad, pero por desgracia también menos actividad antimicótica que la sustancia original. En la siguiente tabla se muestra la solubilidad de la AmB en varios solventes.

Disolvente	Solubilidad (mg l ⁻¹)
Agua	<1 (a pH 6-7)
Metanol	2
Etanol	500
Cloroformo	100
Éter de petróleo	10
Dimetilformamida	2
Plopilenglicol	1
Ciclohexano	20

Tabla 12. Solubilidad de la AmB en diferentes solventes (Lemke *et al.*, 2005) (Schmitt, 2002).

En el análisis de la AmB se pueden detectar impurezas cuyos niveles serán controlados siguiendo los límites establecidos por la Farmacopea Europea. De esta manera, se encuentran dos impurezas definidas la impureza A o anfotericina A (28,29 dihidro-anfotericina B), la impureza B o anfotericina X1 (13-O-metil-anfotericina B) y la impureza C o anfotericina X2 (13-O-etil-anfotericina B) (RFE, 2015).



100

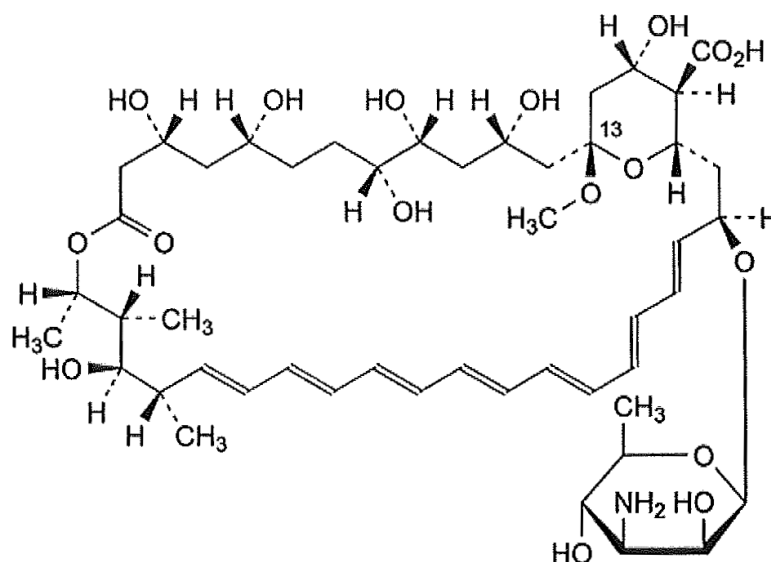


Figura 17. Estructura de la anfotericina X1 (13-O-metil-anfotericina B) (RFE, 2015).

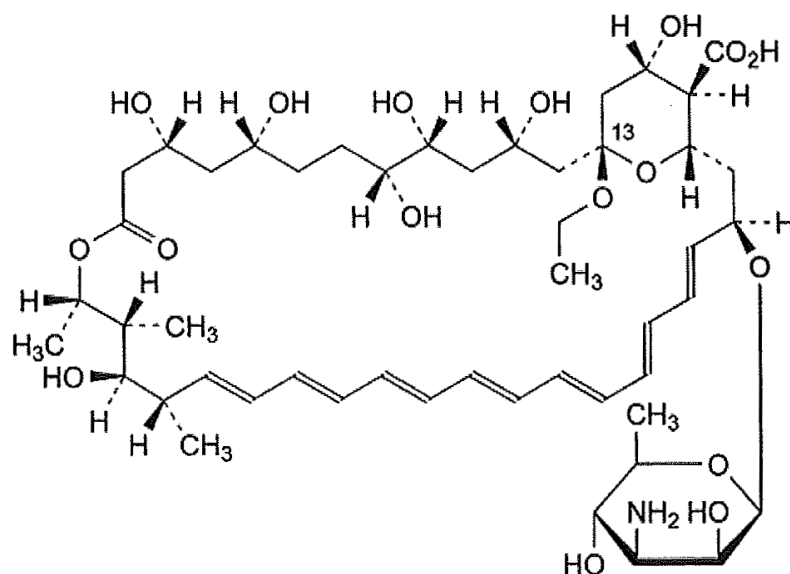


Figura 18. Estructura de la anfotericina X2 (13-O-etil-anfotericina B) (RFE, 2015).

Como la anfotericina A muestra una menor actividad antifúngica que la AmB, su concentración en preparaciones comerciales debe ser menor del 5 %. La pureza e identificación del fármaco obtenido luego del proceso de producción son determinados por UV, IR y HPLC (Lemke *et al.*, 2005).

Conservación y estabilidad

Según la RFE, la conservación de la AmB ha de ser en un recipiente hermético protegida de la luz y entre 2 y 8 °C (RFE, 2015). Este hecho puede ser entendido al analizar los estudios realizados por Groeschke, J. y col., 2006, quienes analizaron la influencia de la luz y de la temperatura sobre la sustancia activa. La degradación de la AmB es mayor al estar expuesta a la luz o a temperaturas de 19-23 °C o 37 °C.

La AmB en estado sólido y a temperatura ambiente es estable durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, cuando la AmB en estado sólido se somete a altas temperaturas, se produce una pérdida de potencia; por ejemplo, la pérdida de potencia es del 17 % cuando se expone a temperaturas de 105 °C durante 16 h, o la pérdida es aún mayor (21 %), si se somete a temperaturas de 158 °C durante 15 minutos. La estabilidad de la AmB en medio líquido es mucho menor. La AmB en tampón fosfato citrato es relativamente estable a un pH entre 5 y 7 y las soluciones de isopropanol/agua (1:1) a pH entre 6-8 son estables durante varios días. Sin embargo, la estabilidad de la AmB es menor en medios acuosos a pH de 4 o 10, y se degrada fácilmente a pH extremos (ej. pH 12). Al igual que en estado sólido, al incrementar la temperatura de las soluciones, la estabilidad de la AmB disminuye considerablemente (la cinética de degradación es el doble de rápida a 70 °C en soluciones acuosas a pH 7 que a 30 °C) (Asher, 1977).

Estado de agregación

El estado de agregación de la AmB es un parámetro complejo ya que condiciona no solo la toxicidad sino también la actividad y la farmacocinética del fármaco (Torrado, *et al.*, 2008). Es un parámetro difícil de controlar, ya que en solución existe un complejo equilibrio entre las diferentes especies (monómero, dímero y poliagregado), el cual puede verse alterado cuando la formulación es diluida (Brajtburg, *et al.*, 1996).

En medios acuosos y a concentraciones muy bajas, la AmB se encuentra en estado monomérico. Sin embargo, debido a su naturaleza anfipática, la AmB tiende a agregarse en medios acuosos. La concentración crítica de agregación (CCA) de la AmB es de 1 µg/ml (Lavanifar, *et al.*, 2002) (Aramwit, *et al.*, 2000). La CCA determina la

concentración mínima a partir de la cual las moléculas de AmB dejan de estar en estado monomérico y comienzan a formarse agregados micelares como consecuencia de la interacción hidrofóbica entre cadenas poliénicas de diferentes moléculas de AmB (Lemke, *et al.*, 2005) (Donovick, *et al.*, 1955) (Torrado, *et al.*, 2008) (Milhaud, *et al.*, 2002). A mayor concentración de AmB en el medio, aumenta no sólo el número de agregados, sino también el tamaño de los mismos (Ruckenstein, *et al.*, 1975).

La AmB cuando se encuentra en estado monomérico da lugar a una disolución completamente transparente de color amarilla (Torrado, *et al.*, 2008). A medida que la concentración de moléculas de AmB en el medio acuoso se incrementa, empiezan a formarse agregados, también denominados dímeros u oligómeros, que dan lugar a una dispersión coloidal translúcida de color amarillo anaranjado (Torrado, *et al.*, 2008). Si se sigue incrementando la concentración de AmB, el grado de agregación de los oligómeros es mayor y se obtienen suspensiones opacas amarillentas (Sánchez, *et al.*, 2004b) (Torrado, *et al.*, 2008).

El tema es bastante complejo, porque los diferentes estados de agregación pueden estar presentes en la misma formulación. Además, la agregación de oligómeros incluye una mezcla de diferentes asociaciones de moléculas de AmB caracterizadas por diferentes tamaños y diferentes capacidades de interacción con membranas biológicas.

Los espectros de absorción se pueden utilizar para el estudio del estado de agregación. El espectro de absorción de la AmB en estado monomérico (ej. AmB solubilizada en solventes orgánicos como DMSO o metanol o a concentraciones muy bajas por debajo de la CCA) se caracteriza por presentar cuatro picos de máxima absorción a las longitudes de onda siguientes: 406-412 nm; 383-388 nm; 363-368 nm; 344-350 nm (Torrado, *et al.*, 2008) (Vandermeulen, *et al.*, 2006) (Darole, *et al.*, 2008).

Cuando la AmB empieza a agregarse y pasa de estado monomérico a estado dimérico, se observa un profundo cambio en su espectro de absorción. Presenta un pico muy destacado a una longitud de onda de 328-340 nm (Barwicz, *et al.*, 1993) (Torrado, *et al.*, 2008); además se puede apreciar un efecto hipocrómico (disminución de la absorbancia) en las bandas localizadas a los 363-368, 383-388 y 406-412 nm así como un efecto batocrómico debido a la nueva banda de absorción entre los 415-425 nm (Barwicz, *et al.*, 1993).

Durante el proceso de agregación, los grupos cromóforos interactúan entre sí por medio de fuerzas hidrofóbicas de manera que los niveles de energía se ven alterados (Ernst, *et al.*, 1981) (Gruszecki, *et al.*, 2012). Cuando se forman agregados de mayor tamaño (poliagregados), la interacción hidrofóbica entre los grupos cromóforos es aún mayor y trae consigo un efecto hipocrómico notable en las bandas de máxima absorción localizadas a los 360-363, 383-385 y 406-420 nm (Torrado, *et al.*, 2008).

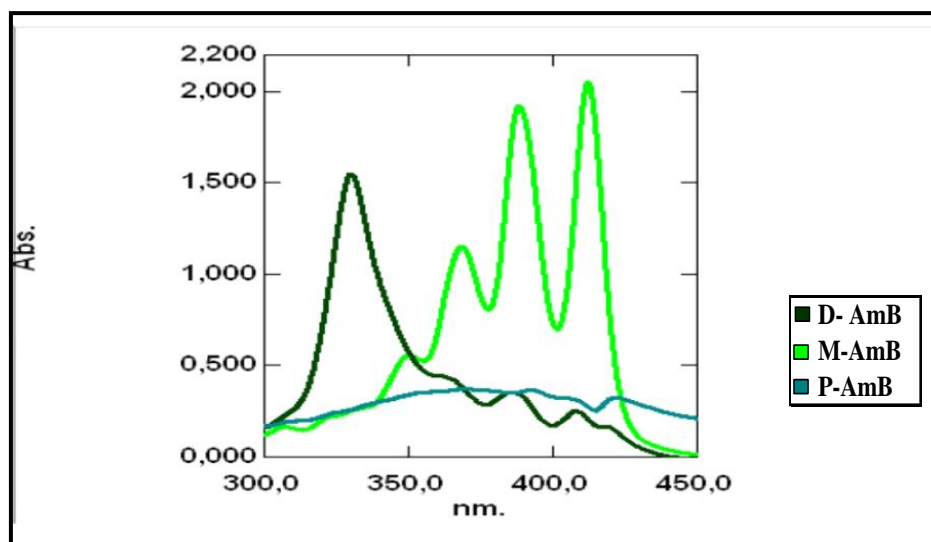


Figura 19. Espectros de absorción de AmB en distintos estados de agregación: (D-AmB) Dímérico, (M-AmB) Monomérico y (P-AmB) Poliagregado. (Espada *et al.*, 2008b).

El estado de agregación de la AmB depende de diferentes factores, tales como la concentración de fármaco (Egito, *et al.*, 2004) (Legrand, *et al.*, 1992) (Brajtburg, *et al.*, 1994) (Kajta'r, *et al.*, 1989), de manera que a concentraciones por debajo de la CCA, la AmB se encontrará en estado monomérico, y a concentraciones superiores comenzará a agregarse (Aramwit, *et al.*, 2000). Pero además de la concentración, existen otra serie de parámetros críticos tales como el empleo de agentes tensioactivos u otros excipientes tales como la albúmina sérica que son capaces de incrementar la CCA de la AmB (Torrado, *et al.*, 2008) (Tancrede, *et al.*, 1990) (Aramwit, *et al.*, 2000). Junto a lo anterior, el empleo de desoxicolato sódico como agente tensioactivo da lugar a formas agregadas, mientras que con la utilización de gamma-ciclodextrina se pueden formar complejos con la AmB en estado monomérico, siempre que se mantenga una cierta

proporción de AmB (Espada *et al.*, 2008a) (Espada *et al.*, 2008b) (Sanchez-Brunete, *et al.*, 2004).

Además de todos los factores anteriores, los métodos de elaboración de las dispersiones (Ernst, *et al.*, 1981) o incluso las temperaturas a las que han sido expuestas (Gaboriau, *et al.*, 1981) (Janoff, *et al.*, 1988) (Lambing, *et al.*, 1993) pueden originar un cambio en el estado de agregación de la AmB (Lambing, *et al.*, 1993) (Gaboriau, *et al.*, 1997).

Aunque, básicamente la prevalencia de una forma u otra de estado de agregación depende de la interacción AmB con el solvente. La AmB se halla en estado monomérico en solventes tales como el dimetilsulfóxido (DMSO), el cual es un solvente altamente polar capaz de formar numerosos puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo de la AmB. En medios acuosos a pH 7,4, predomina la AmB en forma agregada; sin embargo, si se añade metanol como cosolvente se promueve la transformación de los agregados insolubles a formas monoméricas solubles (Torrado, *et al.*, 2008).

Controlar el estado de agregación de la AmB es una tarea compleja, sin embargo es de suma importancia ya que condiciona la interacción con los esteroides de las membranas biológicas y por tanto la toxicidad y la actividad del fármaco (Torrado, *et al.*, 2008). La toxicidad de la AmB se debe a su interacción con el colesterol de las membranas biológicas de las células de mamíferos en vez de con el ergosterol de las células fúngicas y de los parásitos. Aunque existe controversia dentro de la comunidad científica, parece ser que la AmB en estado monomérico presenta mayor selectividad por el ergosterol en comparación con las formas agregadas (Brajtburg, *et al.*, 1996) (Barwicz, *et al.*, 1997). A concentraciones muy bajas en las que la AmB se encuentra completamente en forma monomérica, predomina la asociación con el ergosterol de las membranas biológicas que lleva a la formación de poros o canales que producen la muerte de las células fúngicas y parasitarias. Sin embargo, cuando la concentración de AmB en el medio se incrementa (y empiezan a formarse agregados solubles o dímeros de AmB), se observa además la interacción con el colesterol de las membranas de células de mamíferos que igualmente se traduce en formación de poros o canales en las membranas biológicas que son los que dan lugar a problemas de toxicidad (Bolard, *et al.*, 1991) (Legrand, *et al.*, 1992).

Características farmacológicas

Mecanismo de acción

La actividad antifúngica de la AmB es dosis dependiente de manera que según la dosis administrada podrá presentar una actividad fungicida o fungistática (Sánchez-Brunete, 2002). La AmB es un fármaco relativamente selectivo para las membranas fúngicas debido a que se fija a los esteroides de las membranas celulares tanto de los hongos como humanas, deteriorando la integridad de las mismas. El ergosterol es el esteroide predominante en los hongos, y el colesterol lo es de las bacterias y las células humanas. Debido a esta diferencia, el ergosterol y los diferentes metabolitos y enzimas que participan en su biosíntesis son las dianas de actuación de la gran mayoría de los antifúngicos. Si por el contrario se unen a otros esteroides (colesterol), aunque sea con menor afinidad, se producen los efectos adversos y la toxicidad de esta molécula (Hsuchen, *et al.*, 1973).

La siguiente figura representa la vía biosintética del ergosterol, indicando los lugares de actuación de diversos antifúngicos.

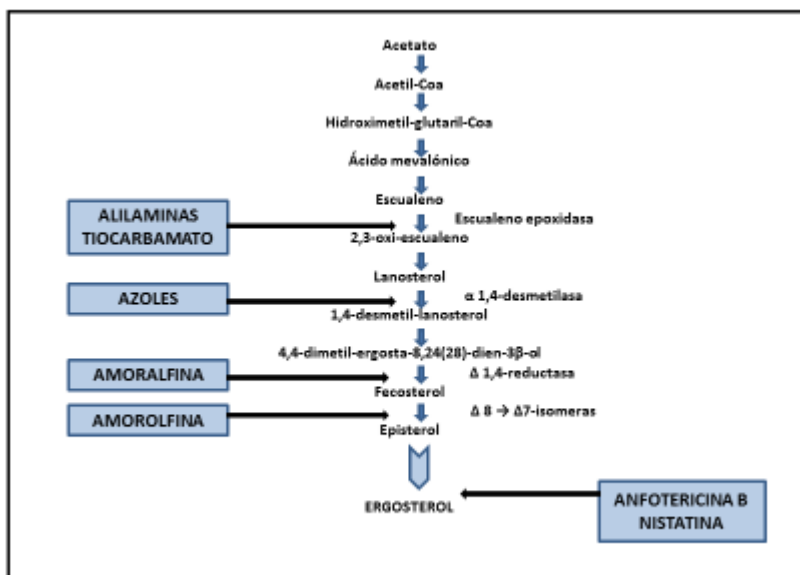


Figura 20. Biosíntesis de ergosterol (Rotger, 1997).

La AmB tiene la capacidad de insertarse en la bicapa de fosfolípidos de las células fúngicas y parasitarias, y unirse al ergosterol gracias a la parte hidrofóbica de la molécula (la cadena poliénica) (Brajtburg, *et al.*, 1990). Se produce una alteración de la permeabilidad de las células, dando lugar a la formación de una serie de poros que incrementan la permeabilidad de la membrana a pequeños cationes tales como K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , promoviendo de esta manera una rápida depleción de iones intracelulares que traen consigo la muerte celular (Kinsky, 1970) (Gennaro, 2003) (Huang, *et al.*, 2002) (Yu, *et al.*, 1998).

La AmB también puede actuar directamente “secuestrando” a los esteroides, y como consecuencia alterando la estabilidad de la membrana celular (Palacios, *et al.*, 2011). En este sentido, se ha propuesto que el “secuestro” de colesterol en las células del hospedador, aunque se relacione con la toxicidad de la AmB, podría resultar beneficioso en cierto tipo de infecciones como la leishmaniasis visceral ya que evitaría la interacción macrófago-parásito y en última instancia la infección de los macrófagos y posterior desarrollo de la enfermedad (Chattopadhyay, *et al.*, 2011).

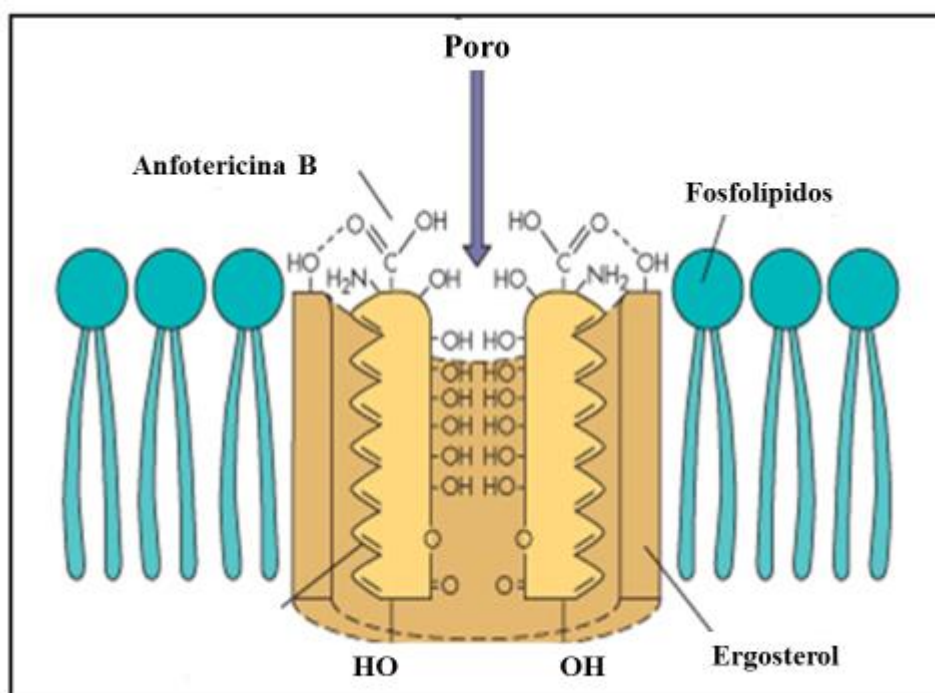


Figura 21. Mecanismo de acción de AmB (Murray, *et al.*, 2006).

Asimismo, numerosos estudios parecen indicar que no es el único mecanismo de acción responsable de producir la muerte celular, se cree que la AmB puede inducir a un estrés oxidativo celular. La AmB parece provocar una cascada de reacciones oxidativas unidas a su propia oxidación y estos metabolitos oxidados pueden actuar como factores de estimulación de los macrófagos que contribuyen a la acción antifúngica. Por otra parte, en su modo de acción, la AmB tiene propiedades inmunoadyuvantes tanto en relación con la inmunidad serológica como con la mediada por células (Serrano, 2013).

Espectro antimicrobiano

La AmB es usada generalmente en el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas y sistémicas, siendo las más frecuentes las causadas por *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. y *Aspergillus* spp. Según la sensibilidad del hongo y la concentración del fármaco en el lugar de la infección, la AmB puede comportarse como fungicida o como fungistático.

No sólo es indispensable para el tratamiento clínico de micosis sistémicas, sino que constituye el más importante fármaco de segunda línea para el tratamiento de leishmaniasis visceral y cutánea (Lemke, *et al.*, 2005).

La AmB también es activa frente otros hongos patógenos tales como: *Absidia* spp., *Basidiobolus* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Conidiobolus* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Mucor* spp., *Paracoccidioides brasiliensis*, *Rhizopus* spp., *Rhodotorula* spp. y *Sporothrix schenckii* (Fernández, *et al.*, 2005) (Ellis, 2002) (Martindale, 2003).

Microorganismo	AMB	FC	KTZ	ITZ	FCZ	VCZ	CAS
Género <i>Candida</i>							
- <i>C. albicans</i>	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++
- <i>C. glabrata</i>	+++	++++	++	++	++	+++	++++
- <i>C. parapsilosis</i>	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++
- <i>C. tropicalis</i>	+++	++++	+++	+++	++++	++++	++++
- <i>C. krusei</i>	++	+	+	++	0	++++	++++
<i>Cryptococcus neoformans</i>	++++	+++	+	++	+++	++++	0
Género <i>Aspergillus</i>	++++	0	0	++++	0	++++	+++
Género <i>Fusarium</i>	+++	0	0	+	0	+++	0
Cigomicetos	++++	0	0	0	0	0	+
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	++++	0	++	++++	+	++++	++
<i>Coccidioides immitis</i>	++++	0	++	++++	++++	++++	++
<i>Histoplasma capsulatum</i>	++++	0	++	++++	++	++++	++
<i>Penicillium marneffei</i>	++++	0	++	++++	++	++++	
<i>Sporothrix schenckii</i>	++++	0	++	++++	++		
Hongos miceliales dermatiáceos	+++	+	++	+++	+	+++	0

Tabla 13. Espectro y actividad antifúngica de antifúngicos con actividad sistémica. [AmB, anfotericina B; CAS, caspofungina; FC, flucitosina; FCZ, fluconazol; ITZ, itraconazol; KTZ, ketoconazol; VCZ, voriconazol; 0, inactivo o no recomendado; +, actividad ocasional; ++, actividad moderada con descripciones de resistencia; +++, actividad fiable con resistencia ocasional; +++++, muy activo, resistencia infrecuente o no descrita (Murray, *et al.*, 2006)].

La mayoría de las cepas son inhibidas a una concentración de AmB de entre 0,03 y 1,0 µg/ml *in vitro*. La principal ventaja de la AmB respecto a otros antifúngicos de uso sistémico es su mayor actividad antifúngica frente a cigomicetos y microorganismos del género *Aspergillus* y *Fusarium* (Sabatelli, *et al.*, 2006).

Por otra parte, presenta actividad frente a algunos protozoos como *Leishmania*, *Naegleria*, *Trypanosoma*, *Acanthamoeba* y *Plasmodium* (Lemke, *et al.*, 2005) (Duma, *et al.*, 1976) (Hatabu, *et al.*, 2005) (Rain, *et al.*, 1996) (Haido, *et al.*, 1989). y también frente a algunas algas como *Prototheca* spp. Sin embargo, no presenta actividad en infecciones bacterianas, víricas u originadas por rickettsias (Martindale, 2003) (Sánchez, 2003).

Resistencias

A pesar del extendido uso de la AmB, la aparición de resistencias es bastante rara. Se han descrito resistencias con algunas cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* y *C. tropicalis* (Ellis, 2002). También se han descrito algunas otras cepas resistentes a la AmB como *S. apiospermum*, *S. prolificans*, *S. schenckii* y *Fusarium* spp., aunque no son especialmente relevantes en la práctica clínica (Ellis, 2002).

Farmacocinética

La absorción en el tubo digestivo es baja o nula. Se obtienen concentraciones plasmáticas máximas de 0,5 a 4 µg/ml, cuando se administra por vía intravenosa; la concentración plasmática media con dosis de mantenimiento de 400 a 600 µg/kg normalmente es 0,5 µg/ml. La AmB se une en una gran proporción a las proteínas plasmáticas y se distribuye ampliamente en el organismo (Martindale, 2003).

También se fija a los tejidos, probablemente a las membranas celulares que contienen colesterol, por lo que su volumen de distribución es elevado, aproximadamente 4 l/kg (Brajtburg, *et al.*, 1984). No penetra bien en los diversos compartimentos del organismo, apenas atraviesa la barrera hematoencefálica, si bien atraviesa la placentaria. Entre los diversos tejidos, las mayores concentraciones de AmB se alcanzan en hígado, bazo, riñón y pulmones. El hígado es el sitio donde se produce la mayor acumulación, conteniendo más del 41 % del total de la dosis (Christiansen, *et al.*, 1985). La AmB se acumula poco en tejido adiposo y en músculo. La concentración de AmB en líquidos peritoneal, pleural y sinovial es habitualmente menor del 50 % de la concentración plasmática, mientras que en el líquido cefalorraquídeo no llega al 4 % de la concentración plasmática, aunque las variaciones interindividuales son muy grandes.

La semivida plasmática es de 24 horas, aunque, con administraciones a largo plazo la semivida terminal aumenta a 15 días (Hutchaleelaha, *et al.*, 1997) (Atkinson, *et al.*, 1978).

Una pequeña cantidad de AmB se excreta lentamente y de forma inalterada por la orina. Se han encontrado trazas de AmB varias semanas después de haber completado el tratamiento. Aunque, la mayoría del fármaco se metaboliza en el hígado y se elimina

por bilis (Craven, *et al.*, 1979). La AmB no puede eliminarse por hemodiálisis (Martindale, 2003). El aclaramiento total (Cl) de la AmB es de aproximadamente 1,8 l/h, mientras que el aclaramiento renal (Cl_R) es muy inferior, sobre 1 ml/min (0,06 l/h).

No existen evidencias científicas en cuanto al metabolismo cutáneo.

El perfil farmacocinético de este fármaco varía en los niños en los que se ha descrito un volumen de distribución menor (< 4 l/kg) y mayor aclaramiento (> 0,026 l/h). Las concentraciones plasmáticas máximas se encuentran reducidas, siendo el 50 % aproximadamente de las alcanzadas en los adultos con dosis equivalentes.

Interacciones con otros fármacos

INTERACCIÓN PRODUCIDA	FÁRMACO
Aumenta el efecto antimicrobiano	Flucitosina Minociclina Norfloxacin Rifampicina
Disminuye el efecto antimicrobiano	Ketoconazol
Aumenta el efecto del fármaco administrado Conjuntamente	Aciclovir Cisplatino Relajantes musculares no despolarizantes
Aumenta la toxicidad del fármaco administrado Conjuntamente	Corticoesteroides Glucósidos digitálicos Pentamidina Zidovudina

Tabla 14. Interacciones de la AmB con otros fármacos (Brime, 2002).

1. Aumenta el efecto antimicrobiano. Incrementa la penetración de la flucitosina, el norfloxacin y la rifampicina en la célula fúngica, debido a la alteración de la permeabilidad de la membrana celular causada por la AmB que aumenta la captación de estos fármacos, o también puede ser debido a un enlentecimiento de la excreción renal de estos fármacos provocada por la nefrotoxicidad que causa la AmB (Beggs, 1986). La

minociclina, debido a su naturaleza lipofílica, también ve incrementado su efecto en presencia de la AmB debido a la interacción del fármaco con los ácidos grasos libres que se encuentran en las membranas de las células fúngicas (Cartwright, 1978) (Hughes, *et al.*, 1984a) (Hughes, *et al.*, 1984b).

2. Disminuye el efecto antimicrobiano. Varios estudios han demostrado la ineficacia de la combinación del ketoconazol y de la AmB en tratamientos de infecciones fúngicas, y se ha demostrado la interfencia de la AmB con la acción de otros imidazoles (Sud, 1983). Los estudios *in vitro* han apoyado la teoría de que la acción de la AmB (que depende de la unión del ergosterol a la membrana celular de los hongos estaría antagonizada por los derivados azólicos (que inhiben la síntesis de ergosterol) (Martindale, 2003).

3. Aumenta el efecto del fármaco administrado conjuntamente. Varios estudios han demostrado el efecto incrementado que ejerce la AmB sobre el aciclovir, el cisplatino y los relajantes musculares no despolarizantes; esto se cree que es debido a la hipocalcemia inducida por la AmB que puede incrementar la actividad de dichos fármacos (Malewicz, *et al.*, 1983) (Bickers, 1994).

4. Aumenta la toxicidad del fármaco administrado conjuntamente. La pérdida de potasio ejercida por la AmB puede verse incrementada por la administración conjunta de corticoesteroides (hidrocortisona), glucocorticoides, mineralocorticoides, inhibidores de la anhidrasa carbónica, corticotropina (ACTH) y glicósidos digitálicos, incrementando la toxicidad de dichos fármacos y pudiendo causar en el paciente una disfunción cardíaca (Bickers, 1994). También el uso de fármacos que causan nefrotoxicidad tales como pentamidina parenteral, aminoglucósidos, ciclosporina A o diuréticos, asociado a la administración de AmB puede incrementar el riesgo de aparición de toxicidad renal, por eso la administración simultánea de estos fármacos debe realizarse bajo un estricto control médico (Antoniskis, *et al.*, 1990). El uso concomitante de la AmB junto con agentes antineoplásicos puede incrementar el riesgo de aparición de broncoespasmos, hipotensión y toxicidad renal. También el uso de AmB junto con sucralfato disminuye los niveles plasmáticos de colistina (19 %), por su posible formación de quelatos no absorbibles, y junto con la zidovudina se potencia la

mielotoxicidad y la neurotoxicidad (USP DI 2000) El uso simultáneo de radioterapia junto con AmB puede incrementar el riesgo de anemias u otros efectos hematológicos.

Efectos adversos y toxicidad

Los efectos adversos que se producen durante o después de una infusión intravenosa de AmB consisten en cefaleas, náuseas, vómitos, escalofríos, fiebre, malestar, dolor muscular y articular, anorexia, diarrea y molestias gastrointestinales. Ocasionalmente, se pueden producir hipertensión, hipotensión, arritmias cardíacas que pueden evolucionar con fibrilación ventricular y paro cardíaco, erupciones cutáneas, reacciones anafilácticas, visión borrosa, pérdida de audición, acúfenos, vértigos, hemorragia digestiva, trastornos hepáticos, neuropatía periférica y convulsiones (Martindale, 2003).

No obstante, el principal efecto adverso posiblemente es la nefrotoxicidad (Sánchez-Brunete, *et al.*, 2004). Se produce tanto lesión tubular, como glomerular, puede observarse una mejoría al interrumpir el tratamiento, pero existe riesgo de que se produzca un trastorno renal permanente, particularmente en pacientes que reciben dosis acumulativas elevadas (más de 5 g). Puede desarrollarse una acidosis tubular renal sin acidosis sistémica. La administración de AmB puede producir un incremento de la excreción urinaria de potasio y magnesio, lo que comporta respectivamente, hipopotasemia e hipomagnesemia. Se produce un incremento de la excreción de ácido úrico y puede aparecer nefrocalcinosis. Algunos datos indican que la toxicidad renal puede relacionarse con la disminución de sodio. Esta nefrotoxicidad cursa con vasoconstricción y una interacción directa con las membranas epiteliales y, en consecuencia, se produce una disminución de la filtración glomerular y la disfunción tubular (Deray, 2002) (Martindale, 2003).

La influencia de la nefrotoxicidad de la AmB es muy elevada siendo frecuentes los fallos renales agudos, cuyos niveles se establecen entre el 49 % y el 65 % (Deray, 2002). Es más, estudios realizados por Wingard, J.R. y col., 1999, mostraban el incremento significativo de la creatinina sérica al comparar dichos niveles con los niveles basales en un porcentaje superior al 50 % de la población, concretamente el 53 % de los pacientes duplicaban los valores de creatinina y el 29 % presentaba un descenso de la funcionalidad renal de, al menos, un 70 %.

La nefrotoxicidad originada por esta sustancia activa puede estar influenciada por factores de riesgo potenciales como la dosis media de AmB administrada al paciente o la administración de dosis acumulativa, la deshidratación, función basal de los riñones alterada, la administración concomitante de sustancias activas nefrotóxicas como la ciclofosfamida o pacientes con riesgo elevado como aquellos pacientes que hayan sido sometidos al trasplantes alogénicos o autólogos de médula ósea frente a los trasplantes sólidos (Deray, 2002).

En la mayoría de los pacientes tratados con AmB, posiblemente debido a un efecto supresivo directo de la producción de eritropoyetina, se desarrolla una anemia normocítica normocrómica reversible. Se ha descrito excepcionalmente trombocitopenia, leucopenia, agranulocitosis, eosinofilia y trastornos de la coagulación.

La aplicación tópica puede producir irritación local, prurito y erupciones cutáneas (Martindale, 2003) (Deray, G., 2002).

Los efectos adversos de este medicamento son, en general, frecuentes e importantes, aunque se pueden evitar mediante la administración de analgésicos, heparina, antihistamínicos y antieméticos; también puede reducirse la incidencia con la administración del fármaco cada 2 días.

Medicamentos comercializados

La AmB se encuentra convencionalmente formulada junto al desoxicolato de sodio (Fungizona®) pero su uso se encuentra limitado debido a los efectos adversos agudos y crónicos que origina (Espada, *et al.*, 2008b).

Las formulaciones de AmB lipídicas empleadas en la práctica terapéutica fueron descritas por Deray, G., 2002, en las que encontramos el AmBisome®, con una estructura liposómica, complejos lipídicos como el Abelcet® o las dispersiones coloidales de AmB donde se encuentran el Amphocil® y el Amphotec®.

Medicamento	Laboratorio titular	Estado del medicamento	Condiciones de Prescripción y Uso	Estado comercialización
ABELCET 5 mg/ml concentrado para suspensión para perfusión	Teva Pharma S.L.U.	Autorizado	<u>Uso Hospitalario</u>	Comercializado
<p>Indicaciones terapéuticas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Tratamiento de la candidiasis invasiva grave. ➤ Tratamiento de micosis sistémicas graves tales como aspergilosis, criptococosis, fusariosis, zigomicosis, blastomicosis y coccidioidomicosis en pacientes que no han respondido al tratamiento con amfotericina B deoxicolato o con otros agentes antifúngicos sistémicos, en pacientes con insuficiencia renal u otras contraindicaciones al tratamiento con amfotericina B deoxicolato o en pacientes que han desarrollado nefrotoxicidad debido a la AmB deoxicolato. ➤ Tratamiento de la leishmaniasis visceral. ➤ Profilaxis secundaria de la leishmaniasis visceral en pacientes con infección por VIH con recuento de linfocitos T CD4+ < 200 células/μl. <p>Posología y forma de administración:</p> <p>Abelcet se administra mediante perfusión intravenosa, previa dilución con glucosa al 5 %. La concentración final de perfusión debe ser de 1 mg/ml. En el caso de niños o pacientes con enfermedades cardiovasculares, se recomienda una concentración final de 2 mg/ml. La perfusión intravenosa debe administrarse a una velocidad de 2,5 mg/kg/hora. En todos los casos la dosis recomendada se administrará una única vez al día. La primera administración de Abelcet debe ir precedida de una dosis de prueba.</p>				
<u>AMBISOME 50 mg polvo para solución para perfusión</u>	Gilead Sciences, S.L.	Autorizado	<u>Uso Hospitalario</u>	Comercializado
<p>Indicaciones terapéuticas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Tratamiento de micosis sistémicas graves. ➤ Tratamiento empírico de las micosis en pacientes con neutropenia grave, como 				

3. PARTE TEÓRICA: Diseño y elaboración de formulaciones tópicas

Medicamento	Laboratorio titular	Estado del medicamento	Condiciones de Prescripción y Uso	Estado comercialización
<p>consecuencia de patologías hematológicas malignas o por el uso de fármacos citotóxicos o inmunosupresores.</p> <p>➤ Leishmaniasis visceral en inmunocompetentes e inmunocomprometidos que no hayan respondido a antimoniales ni a AmB convencional.</p> <p>Posología y forma de administración:</p> <p>La concentración recomendada para la administración intravenosa es desde 0,2 mg/ml a 2 mg/ml de AmB, como AmBisome. La dosis de AmBisome, se debe ajustar a los requerimientos específicos de cada paciente.</p> <p>AmBisome se debe administrar por perfusión intravenosa durante un periodo comprendido entre 30 y 60 minutos.</p>				
<p><u>AMPHOCIL</u> <u>100 mg</u></p> <p>Cada vial contiene 100 mg (100.000 U.I.) de AmB USP, formando un complejo con el sulfato sódico de colesteroilo</p>	Farmatec Investigacion, S.L.	Autorizado	Uso Hospitalario	Comercializado
<p><u>AMPHOCIL</u> <u>50 mg</u></p> <p>Cada vial contiene 50 mg (5.000 U.I.) de AmB USP, formando un complejo con el sulfato sódico de colesteroilo</p>	Farmatec Investigacion, S.L.	Autorizado	Uso Hospitalario	Comercializado

Medicamento	Laboratorio titular	Estado del medicamento	Condiciones de Prescripción y Uso	Estado comercialización
<p>Indicaciones terapéuticas:</p> <p>Tratamiento de aspergillosis invasiva en pacientes con insuficiencia renal o toxicidad inaceptable lo que impide el uso de Anfotericina B en dosis efectivas y en pacientes donde el anterior tratamiento sistémico antifúngico ha fallado.</p> <p>Posología y forma de administración:</p> <p>El tratamiento puede comenzar con una dosis diaria de 1,0 mg/kg de peso corporal, que irá aumentando hasta alcanzar la dosis recomendada de 3,0-4,0 mg/kg según precise. En algunos pacientes se han llegado a alcanzar dosis de 6 mg/kg. La posología debe ajustarse a las necesidades individuales de cada paciente. La dosis acumulada media en estudios clínicos fue de 3,5 g, siendo la mediana de la duración de los tratamientos de 16 días. Un 10 % de los pacientes recibieron 13 g o más Amphocil durante un periodo de 27 a 409 días.</p> <p>Administración: Amphocil se administra mediante infusión intravenosa a una velocidad de 1-2 mg/kg/hora. Si el paciente experimenta reacciones agudas o no puede tolerar el volumen de infusión, puede ampliarse el tiempo de administración. Los pacientes que hayan sufrido con anterioridad reacciones adversas relacionadas con la infusión pueden ser tratados previamente con, por ejemplo, paracetamol, antihistamínicos, antieméticos.</p>				

Tabla 15. Medicamentos comercializados en España que contengan como principio activo la AmB (AEMPS, 2014).

3.2.3.2 Orabase®

La base utilizada, Orabase® (Fagron S.L., Madrid, España) se considera un adhesivo especialmente concebido para ser aplicado sobre la mucosa oral. Está constituido por:

- Carboximetil celulosa sódica..... 16,58 %
- Pectina..... 16,58 %
- Gelatina..... 16,58 %
- Plastibase®.....c.s.p. 100 g
- (Plastibase®: Parafina líquida:polietileno, 95:5)

Se presenta como una masa untuosa, de incolora a amarillenta, inodora y prácticamente insípida. Su escasa solubilidad en la saliva le permite permanecer adherido a la mucosa de la cavidad oral por un periodo de hasta 2 horas, dependiendo de la movilidad y la situación del punto de aplicación.

Puede utilizarse sin ningún principio activo buscando únicamente una acción protectora. Sin embargo, es más frecuente incorporar diversos principios activos, que van liberándose paulatinamente durante el tiempo de aplicación. La incorporación de estos principios activos se realiza en general, mezclándolos en el mortero con un poco de vaselina u otra grasa líquida, y añadiendo posteriormente Orabase®.

Junto con Orabase® nunca se debe utilizar el agua ni ningún otro excipiente hidromiscible pues favorecería la disolución de la saliva (Arco, 2004).

Según su ficha técnica, se aplican aproximadamente 60 a 250 mg de excipiente adhesivo oral en el lugar de la lesión en forma de una lámina delgada, después de las comidas y retirándolo antes de ellas. Puede presentar una ligera textura granulosa. Y se debe conservar en envases bien cerrados y protegido de la luz.

Fórmulas con Orabase®.

1. Triamcinolona acetónido 0,1 %

Orabase® c.s.

2. Lidocaína HCl 2 %

Orabase® c.s.

3. Ketoconazol 2 %

Orabase® c.s.

4. Nistatina 100000 U.I./g

Lidocaína HCl 2,5 %

Triamcinolona acetónido 0,1 %

Orabase® c.s.

5. Aciclovir 2 %

Orabase® c.s.

Modus Operandi: Es el mismo para todas las fórmulas con Orabase®. Una vez bien pulverizado los principios activos, se hace una pasta en el mortero con vaselina líquida y luego se incorpora el excipiente Orabase® (Arco, 2004).

3.2.3.3 Dimetilsulfóxido

Estructura y características físico-químicas

La fórmula empírica del dimetilsulfóxido (DMSO) (Scharlab S.L., España) es C_2H_6OS . Y su estructura química se muestra a continuación:

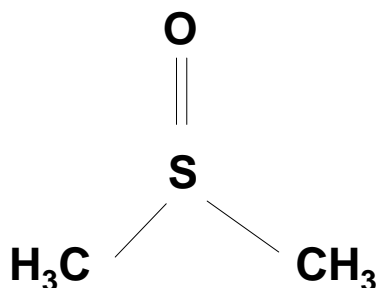


Figura 22. Estructura química del DMSO (Rowe, *et al.*, 2009).

El DMSO se presenta como un líquido viscoso incoloro, o como cristales incoloros que son miscibles con agua, alcohol y éter. Este componente tiene un sabor ligeramente amargo con un regusto dulce, y es inodoro o tiene un ligero olor característico de dimetilsulfóxido.

El DMSO es extremadamente higroscópico, absorbiendo hasta el 70 % de su propio peso en agua con desprendimiento de calor (Rowe, *et al.*, 2009). De entre sus características físico-químicas destacan:

- Acidez/alcalinidad: pH= 8,5 (para una mezcla 50:50 con agua)
- Punto de ebullición 189 °C
- Punto de fusión 18,5 °C
- Densidad: 10955 g/cm³ a 25 °C

- Solubilidad en agua a 20 °C: soluble
- Viscosidad a 20 °C, 2,3 mPa/s
- Peso molecular 78,13 g/mol

Indicaciones

Es una sustancia altamente polar, por lo tanto, carece de propiedades ácidas y básicas. Posee excelentes propiedades como disolvente y co-solvente para sustancias químicas orgánicas e inorgánicas (Rowe, *et al.*, 2009), por ello es utilizado a nivel industrial (Catalán, *et al.*, 2001).

El DMSO mejora la penetración tópica de fármacos debido a su capacidad para desplazar el agua unida al estrato córneo; esto va acompañado de la extracción de lípidos y cambios configuracionales de las proteínas (Anigbogu, *et al.*, 1995). Se han descrito aumentos en la penetración de fármacos a con concentraciones de DMSO tan bajas como 15 %, pero un aumento significativo en la permeabilidad generalmente requiere concentraciones superiores al 60-80 %.

Presenta un amplio espectro de actividades farmacológicas incluyendo penetración a través de membranas, efectos antiinflamatorio, analgésico local, bacteriostático débil, diurético, vasodilatador, disolución del colágeno y eliminación de radicales libres. Disuelve también cálculos biliares (Murdoch, 1982) (Fischer, 1981) (Namaka, *et al.*, 1994) (Parker, *et al.*, 1982) (Ely, *et al.*, 2002).

Su utilidad principal es como vehículo de fármacos como la idoxuridina o el aciclovir (Galayo, 2006). Promueve la penetración del fármaco a través de la piel por actuar directamente sobre el estrato córneo desorganizándolo reversiblemente y promoviendo por tanto el efecto del fármaco (Pérez, *et al.*, 2003). Puede administrarse por vía tópica, oral e intravenosa para un amplio rango de indicaciones como desórdenes cutáneos y musculoesqueléticos, pero no existe una clara evidencia de sus efectos beneficiosos (Forouzanfar, *et al.*, 2002) (Tran, *et al.*, 2010). También está descrito su uso en solución acuosa al 50 % para el alivio sintomático en cistitis

intersticial: se instilan en la vejiga 50 ml en 15 minutos, y se repite al tratamiento cada 2 semanas (Dawson, *et al.*, 2007).

Administrado por vía intravenosa puede ser útil para disminuir la hipertensión intracraneal, pero este uso no está aún muy extendido por la dificultad en la administración y porque se produce además sobrecarga de fluidos (Fowler, 1981) (Ryan, *et al.*, 1990) (Jacob, *et al.*, 2015).

Administrado por vía tópica es útil también para la extravasación de agentes antineoplásicos (Laurence, *et al.*, 1983) (Rospond, *et al.*, 1993) (Castro, *et al.*, 2006).

El DMSO es utilizado como crioprotector para varios tejidos humanos (Swanson, 1985) (Trice, *et al.*, 1985) (Higgins, *et al.*, 1987).

Farmacocinética

Se absorbe rápidamente y se metaboliza por oxidación a dimetilsulfona y mediante reducción a sulfuro de dimetilo. El DMSO y su metabolito sulfona se excretan por la orina y heces; mientras que el sulfuro de dimetilo se excreta a través de los pulmones y la piel, siendo responsable del característico olor de los pacientes (Gaspar, *et al.*, 2012).

Estabilidad y condiciones de almacenamiento

Según la información proporcionada por el fabricante Gaylord Chemical Company, L.L.C, el DMSO es razonablemente estable al calor. Por ejemplo, manteniéndolo a 150 °C durante 24 horas, se puede esperar una pérdida de entre 0,1 y 1 %. Aunque cerca del 5 % de DMSO se descompone a reflujo después de 24 horas. Esta descomposición es ayudada por ácidos, y se retarda por la presencia de numerosas bases. Cuando comienza la descomposición, se emiten humos tóxicos. Casi la mitad del peso de los materiales volátiles es paraformaldehído. El sulfuro de dimetilo, el disulfuro de dimetilo, bis-(metiltio) metano y el agua son otros productos volátiles. Se puede encontrar una pequeña cantidad de dimetilsulfona. A temperaturas entre 40 y 60 °C, el DMSO se degrada parcialmente, esto es percibido por los cambios en las propiedades

físicas, tales como índice de refracción, densidad y viscosidad (Jacob, *et al.*, 1971) (Rowe, *et al.*, 2009).

El DMSO se debe almacenar en recipientes herméticos. La Farmacopea Europea establece que estos recipientes deben ser de vidrio. El contacto con los plásticos debe ser evitado (Rowe, *et al.*, 2009).

Toxicidad

El DMSO tiene baja toxicidad sistémica pero causa efectos tóxicos locales (Brobyn, 1975) (Willhite, *et al.*, 1984) (Mottu, *et al.*, 2000).

Se absorbe fácilmente después de la inyección o después de la administración oral o percutánea y se distribuye ampliamente en todo el cuerpo. Sus efectos adversos dependen de la vía de administración (Martindale, 2003) (AEMPS, 2014).

Cuando se aplica en concentraciones elevadas puede ser un irritante primario de la piel, causando enrojecimiento, ardor, picazón y descamación. También provoca urticaria y su uso continuado puede causar descamación (Gaspar, *et al.*, 2012).

Los síntomas sistémicos incluyen náuseas, vómitos, escalofríos, calambres y letargo. También puede causar un aumento de la presión intraocular y reacciones de hipersensibilidad (Creus, 2002). Su administración por cualquier vía, va seguido por un olor a ajo característico en el aliento.

Puede producirse hemólisis intravascular y cambios bioquímicos (Yellowlees, *et al.*, 1980), y deterioro neurológico reversible (Bond, 1989), después de la administración intravenosa. Sin embargo, se ha cuestionado si estos hallazgos eran directamente atribuibles al DMSO en lugar de a la terapia o fármacos utilizados (Knott, 1980).

En España, el DMSO se usa como excipiente de diversos medicamentos como el Artrodesmol® crema (Laboratorios Asociados Nupel, S. L.) (AEMPS, 2014) y como vehículo en formulación magistral.

3.2.3.4. γ -Ciclodextrinas.

En 1891, Villiers aisló un grupo inusual de oligosacáridos no reductores, por la acción de la bacteria *Bacillus Macerans* en un medio rico en almidón, las ciclodextrinas (CD). Sin embargo, hasta 1904 Schardinger (Schardinger, 1904) no determinó la estructura de dichos compuestos (Duchene, *et al.*, 1989) (Rodríguez Galán, 1993).

Se obtienen durante la degradación enzimática del almidón y consisten en una serie de oligosacáridos cíclicos formados por 6 (α), 7 (β) u 8 (γ) unidades de α -D-[1,4] glucopiranosas, que dan lugar a una estructura molecular toroidal, rígida y con una cavidad interior de volumen específico. Los grupos hidroxilo primarios en posición 6 están localizados en el lado más estrecho del toroide, mientras que los grupos hidroxilo secundarios se ubican en el lado más ancho del mismo (Martínez, *et al.*, 2007).

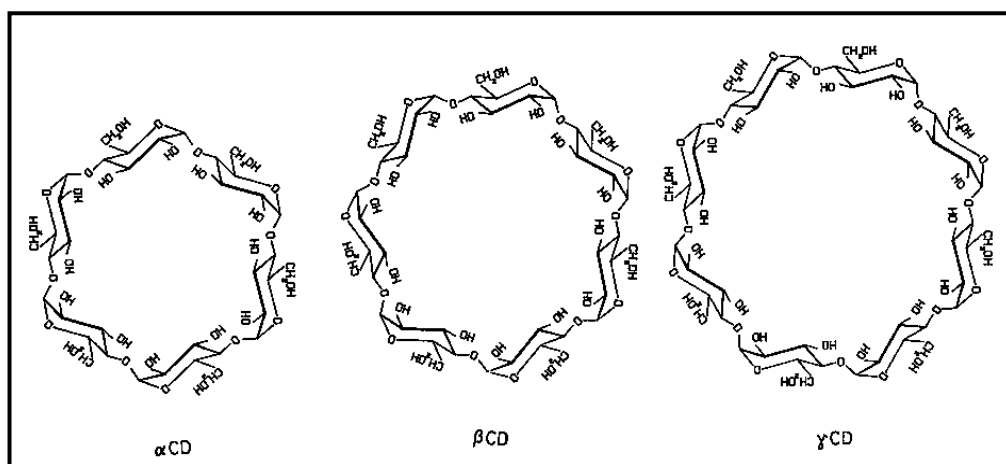


Figura 23. Estructura de α , β y γ -CD (Frömming, *et al.*, 1994).

Las CD como materiales polihidroxilados han sido objeto de una amplia variedad de reacciones, siendo el ataque electrofílico al grupo OH el tipo de reacción más estudiado (Martínez, *et al.*, 2007). Evidentemente, en dichas reacciones los grupos hidroxilo primarios OH en la posición 6 son los que reaccionan preferentemente, mientras que los hidroxilos secundarios OH en la posición 2 tienen la mayor acidez ($pK_a = 12,2$).

Los hidroxilos secundarios OH (3) son los menos reactivos, pudiendo reaccionar selectivamente cuando los OH (2) y OH (6) han sido bloqueados previamente. El

estudio de estas distintas reacciones de CD, para la obtención de diferentes derivados, ha sido objeto de numerosas investigaciones (Saenger, 1980) (Szejtli, 1982) (Wenz, 1994) (Szejtli, *et al.*, 1996) (Harada, 1997) (Szejtli, 1998) (Takahashi, 1998). Mediante estudios de rayos X se sabe que los hidrógenos de los grupos hidroxílicos (C3) de cada anillo forman puentes de hidrógeno con los oxígenos de los grupos hidroxílicos (C2) adyacentes, estabilizándose de esta forma la molécula. Este enlace por puentes de hidrogeno intramoleculares, que persiste en solución, estabiliza estas moléculas y se cree que es el responsable en parte de la forma toroidal (Junquera, 1992). La unión por puentes de hidrógeno es incompleta para la molécula de α -CD ya que una de las unidades de glucopiranososa está en una posición distorsionada, por lo que sólo cuatro de las seis posibles uniones por puentes de hidrógeno pueden ser establecidos. La γ -CD tiene una estructura no coplanar lo cual hace que sea más flexible y por lo tanto, la más soluble de las tres (Frömming, *et al.*, 1994). Esta estructura tan característica y las interacciones que existen entre sus grupos funcionales, hace que la molécula de CD adquiera un carácter hidrofílico en su parte externa y apolar en la interna (Rodríguez, 1993).

Como consecuencia de que los grupos hidroxilo libres están situados en el exterior de la superficie de los anillos, las CD son hidrófilas y solubles en agua y su solubilidad es el resultado de la capacidad de interacción de dichos grupos hidroxilo con el medio acuoso, siendo mayor para la γ -CD y la α -CD. Las CD son igualmente solubles en disolventes apróticos fuertemente polares, como el dimetilsulfóxido y la dimetilformamida. También son estables en disoluciones neutras y básicas, pero se degradan lentamente en pH ácido (Martínez, *et al.*, 2007). En estado sólido se descomponen por encima de 200 °C. A continuación, se muestran algunas características de las CD (Frömming, *et al.*, 1994).

Propiedades fisicoquímicas	α	β	γ
Nº. Unidades de glucosa	6	7	8
Diámetro cavidad interna Å	5	6	8
Peso Molecular	973	1135	1297
Tª de fusión (°C)	275	280	275
Solubilidad acuosa g/100 ml (25 °C)	15	1,85	23
Contenido acuoso (%)	10	13	16
Vida media abertura anillo (h)	6,2	5,4	3,0

Tabla 16. Propiedades fisicoquímicas de ciclodextrinas (Frömming, *et al.*, 1994) (Faulí, *et al.*, 1993).

El anillo de las CD en realidad es un cilindro cónico, frecuentemente caracterizado como un cono truncado (Szejtli, 1997).

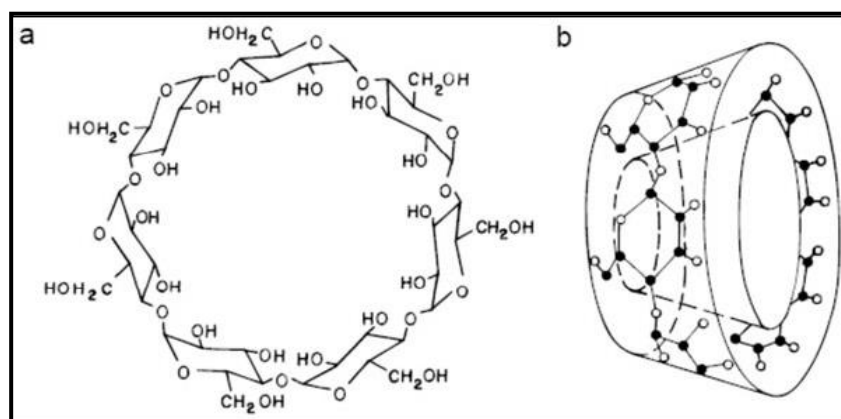


Figura 24. Estructura química (a) y la forma toroidal (b) de la α -CD (Frömming, *et al.*, 1994).

La cavidad interior de las CD es hidrófoba, por lo que estos compuestos son capaces de albergar moléculas hidrófobas más pequeñas para formar complejos “anfitrión-huésped”, en los que la molécula huésped queda encapsulada por la CD. De esta forma, las CD pueden formar compuestos cristalinos a partir de moléculas orgánicas huésped en estado sólido, líquido e incluso gaseoso. En consecuencia, moléculas insolubles en agua pueden llegar a ser completamente solubles mediante un tratamiento con disoluciones acuosas de CD, sin que se produzca modificación química alguna en la molécula huésped, ya que no se origina ningún enlace covalente durante la interacción entre la CD y la molécula insoluble en agua (Saenger, 1980) (Szejtli, 1988) (Wenz, 1994) (Martínez, *et al.*, 2007).

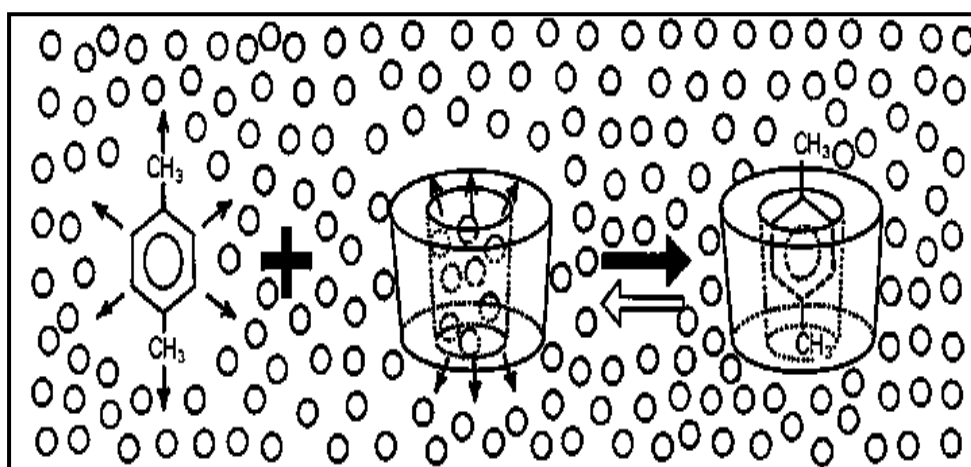


Figura 25. Representación esquemática de la asociación en disolución del anfitrión (CD) y el huésped (p-xileno) (Szejtli, 1997).

La formación de complejos de un principio activo con una CD puede ser una interesante estrategia de formulación en los siguientes casos:

- Cuando el compuesto es muy poco soluble, por consiguiente su biodisponibilidad es incompleta o irregular.
- El compuesto es químicamente inestable, porque puede fácilmente degradarse por autodescomposición, polimerización o degradación por el oxígeno atmosférico, humedad absorbida, luz, etc. ocasionando un fármaco desarrollado con una vida media no satisfactoria.
- El compuesto es físicamente inestable: volatilización o sublimación ocasionarían pérdida por migración de un producto originalmente homogéneo a uno heterogéneo, o al ser higroscópico podría alterarse al aire libre, etc.
- La aceptabilidad del compuesto es mala, debido a que tiene mal olor o sabor amargo desagradable.
- El compuesto es líquido, pero se requiere una forma farmacéutica de comprimidos, polvos, nebulizados acuosos, etc.
- La dosis a utilizar es demasiado baja, por consiguiente la uniformidad de contenido en el producto es problemática.
- El compuesto es incompatible con otros componentes de la formulación.
- Se requiere disminuir serios efectos secundarios (irritación de garganta, ojos, piel o estómago).
- El compuesto tiene una extremadamente alta actividad biológica (en este caso se debe utilizar dosis muy bajas) y trabajar con el producto puro directamente podría ser peligroso (Szejtli, 1997).

La preparación de los complejos de inclusión con CD es generalmente sencilla para moléculas hidrófobas de pequeño tamaño. La formación de los complejos puede ser realizada en una solución homogénea o en una suspensión bajo presión, por simple

mezcla de sus componentes, o por fusión conjunta del huésped potencial con la CD (Frömming, *et al.*, 1994).

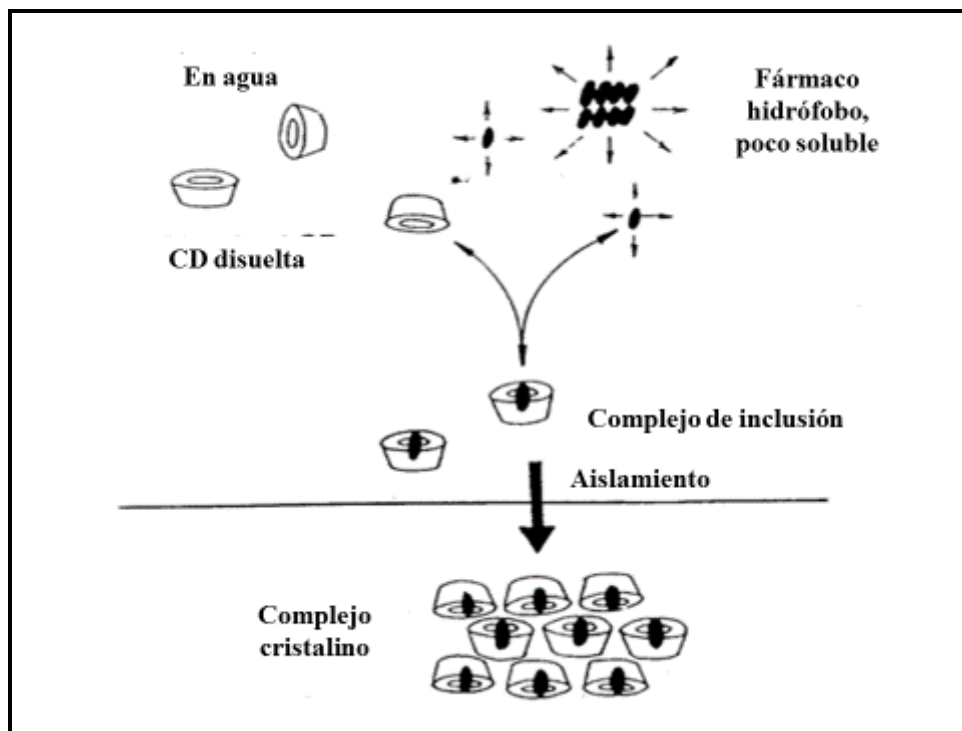


Figura 26. Representación esquemática de la formación de un complejo cristalino de CD (Szejtli, 2004).

Entre las técnicas empleadas para aislar los complejos de inclusión al estado sólido, destacan operaciones de liofilización, atomización o evaporación del disolvente donde se encuentra el complejo, incluso se han obtenido complejos de inclusión en fase sólida, termodinámicamente espontánea, mediante molienda de la CD con el fármaco durante tiempo suficiente (Rodríguez, 1993).

A nivel tópico pueden ser utilizadas para optimizar el transporte de fármacos a nivel dérmico, local o sistémico. Al afectar el coeficiente de partición del fármaco respecto a piel/vehículo, las CD inducen cambios en la permeabilidad de los fármacos a través de la piel.

Las CD también pueden ser empleadas para reducir la degradación de los fármacos en preparaciones tópicas. Al incrementar la solubilidad de los compuestos, las

CD facilitan la incorporación del fármaco dentro de la formulación y por lo tanto incrementan la concentración del fármaco en la misma.

Aunque sólo insignificantes cantidades de CD y complejos fármaco/CD pueden penetrar dentro de las barreras biológicas por su tamaño y por ser hidrofílicas; las CD pueden interactuar con algunos componentes de la piel. Existen trabajos en los cuales las CD se liberan en la disociación del complejo con el fármaco, y debido a su capacidad de eliminar algunos componentes de la superficie de la membrana, puede modificar sus propiedades de transporte y por consiguiente facilitar la absorción del fármaco, especialmente de compuestos solubles en agua (Challa, *et al.*, 2005).

3.2.4 Elaboración de las formulaciones

Se desarrollaron tres formulaciones principales denominadas como: *Pomada Base*, *Pomada Ciclodextrinas* y *Pomada Dimetilsulfóxido*, cuyas concentraciones finales de AmB (Azelis, Barcelona, España) fueron iguales para todas ellas, 0,125 % p:p. También se incluye en este capítulo un apartado de formulaciones secundarias, en solución, que se utilizaron como control tanto en los ensayos de difusión *ex-vivo*, como en los ensayos microbiológicos.

Pomada Base (AmB)

Composición:

AmB 0,125 g

Orabase® c.s.p. 100 g

Modus operandi:

Se tomaron 125 mg de AmB y se llevaron a un mortero. Se pulverizó lentamente hasta obtener un polvo homogéneo. Se le adicionó una fracción de Orabase® para hacer una mezcla homogénea y finalmente se incorporó poco a poco y con una constante agitación el resto de la base hasta su total homogenización.

Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD)

Composición:

AmB 0,125 g

γ -Ciclodextrinas 12,5 g

Orabase® c.s.p. 100 g

Modus operandi:

Se preparó una solución para formar el complejo AmB con CD, según los procedimientos descritos por H. Ruiz en 2010 (Ruiz, 2010):

Se disolvieron 12,5 g de γ -CD (Ashland Industries Europe, Suiza) en aproximadamente 50 ml de agua desionizada, la solución obtenida se llevó a pH 12,0 con hidróxido de sodio 2 N, se adicionaron 125 mg de AmB con agitación constante hasta su total disolución y se llevó la solución obtenida a pH 5,5 utilizando ácido fosfórico 2 N, para finalmente completar el volumen a 100 ml con agua desionizada.

Esta solución se liofilizó con el fin de eliminar totalmente el agua del preparado. Al polvo resultante, previamente pulverizado en un mortero, se le adicionó una fracción de Orabase® para hacer una mezcla homogénea y finalmente se incorporó poco a poco y con una constante agitación el resto de la base hasta su total homogenización.

Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO)

Composición:

AmB 0,125 g

DMSO 12,5 g

Orabase® c.s.p. 100 g

Modus operandi:

Se tomaron 125 mg de AmB y se llevaron a un mortero. Se pulverizó lentamente hasta obtener un polvo homogéneo. Se le adicionó poco a poco 12,5 g de DMSO, en constante agitación y homogeneizando. Finalmente, y de la misma manera que en las anteriores formulaciones, se añadió Orabase® consiguiendo una mezcla homogénea.

Otras formulaciones

- Suspensión 1: AmB (H₂O): AmB 0,125 % (p:p)

Modus operandi: Se tomaron 50 ml de agua desionizada y se llevaron a pH 12,0 con hidróxido de sodio 2 N. Posteriormente, se adicionaron 125 mg de AmB con agitación constante hasta su total disolución y se llevó la suspensión obtenida a pH 5,5 utilizando ácido fosfórico 2 N, para finalmente completar el volumen a 100 ml con agua desionizada.

- Solución 2: AmB-CD (H₂O): AmB:CD; 0,125:12,5 (p:p)

Modus operandi: Se disolvieron 12,5 g de CD en aproximadamente 50 ml de agua desionizada, la solución obtenida se llevó a pH 12,0 con hidróxido de sodio 2 N, se adicionaron 125 mg de AmB con agitación constante hasta su total disolución y se llevó la solución obtenida a pH 5,5 utilizando ácido fosfórico 2 N, para finalmente completar el volumen a 100 ml con agua desionizada.

- Solución 3: AmB (DMSO): AmB 0,125 % (p:p)

Modus operandi: Se tomaron 50 ml de DMSO y se le adicionaron poco a poco 125 mg de AmB con agitación constante hasta su total disolución. Finalmente se completó el volumen a 100 ml con DMSO.

- Solución 4: AmB_c (DMSO): AmB 0,625 % (p:p)

Modus operandi: Se tomaron 50 ml de DMSO y se le adicionaron poco a poco 625 mg de AmB con agitación constante hasta su total disolución. Finalmente se completó el volumen a 100 ml con DMSO.

3.3.1 Método de cuantificación de la anfotericina B

La técnica analítica escogida para la cuantificación de AmB en todas las formulaciones fue la **Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**, según el método desarrollado y validado por Espada, R. y col., 2008b. Dado que se hacía un pequeño cambio en la matriz, se hicieron las pruebas necesarias para demostrar que el cambio de matriz no influía en los resultados.

Se utilizó un HPLC modular Jasco con:

- Bomba (Jasco PU-1580)
- Desgasificador (Jasco DG-2080-53)
- Formador de gradiente (Jasco LG-208-02)
- Detector UV/Visible (Jasco UV-1575)
- Inyector automático de muestras (Jasco AS-2050-Plus)
- Interfaz de cromatografía (Hercule Lite)

La fase estacionaria empleada fue una columna BDS Hypersil® C18 (tamaño 250 x 4,6 mm), con tamaño de partícula igual a 5 µm. La fase móvil consistió en acetonitrilo: ácido acético: agua (52:4,3:4,7), fluyendo a 1,0 ml/min a temperatura ambiente y con un volumen de inyección de 100 µl. El tiempo de análisis fue de 15 min, ya que el tiempo de retención de la AmB es de 6,9 min y la detección de este principio activo se realizó a una longitud de onda de 406 nm. Se comprobó que la señal correspondiente al área cromatográfica y la concentración se ajustan a una recta en el intervalo de 0,002 y 0,5 µg/ml en el que se cumple la ley de Lambert-Beer. Los datos de la recta de regresión obtenida fueron:

- $y = 532,41x + 7,84$ donde y se corresponde con el área de pico y x con la concentración en µg/ml
- $r^2 = 0,996$

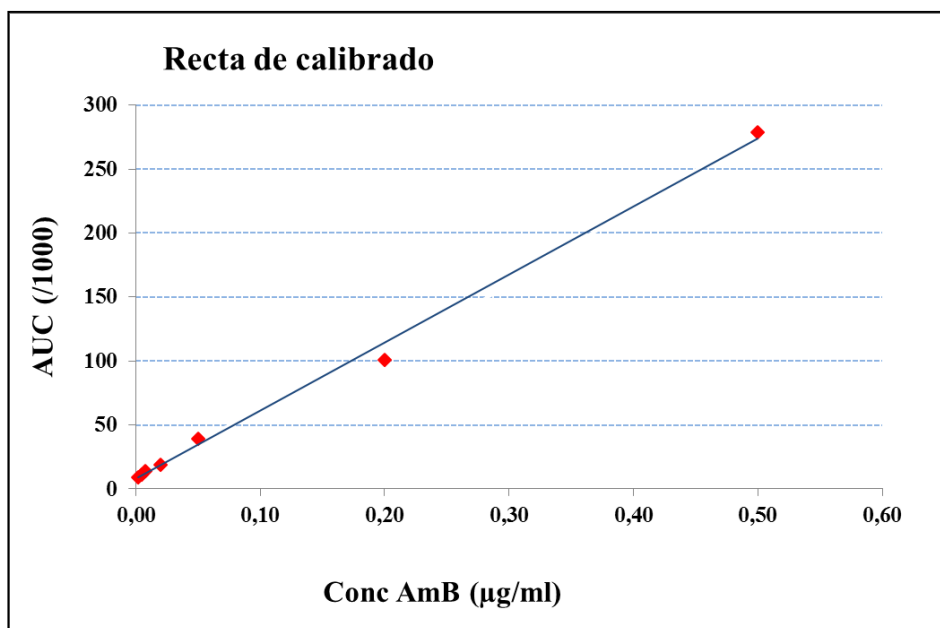


Figura 27. Recta de calibrado.

Para la realización de esta recta se partió de una solución patrón de AmB en DMSO que se diluye hasta obtener una serie de soluciones con un intervalo de concentraciones comprendido entre 0,002 y 0,5 µg/ml, siguiendo el mismo tratamiento que en el apartado “*Protocolo de análisis de las muestras biológicas*”.

Protocolo de preparación de las muestras patrón

1. Pesar exactamente 20 mg de AmB y llevarla a un matraz aforado de 50 ml clase A.
2. Añadir DMSO poco a poco en agitación constante hasta la disolución total y enrasar.
3. Tomar 62,5 µl de esta disolución y llevarlo a un matraz aforado de 50 ml. Añadir una mezcla metanol: agua (50:50, v:v) en agitación constante hasta su total disolución y enrasar.

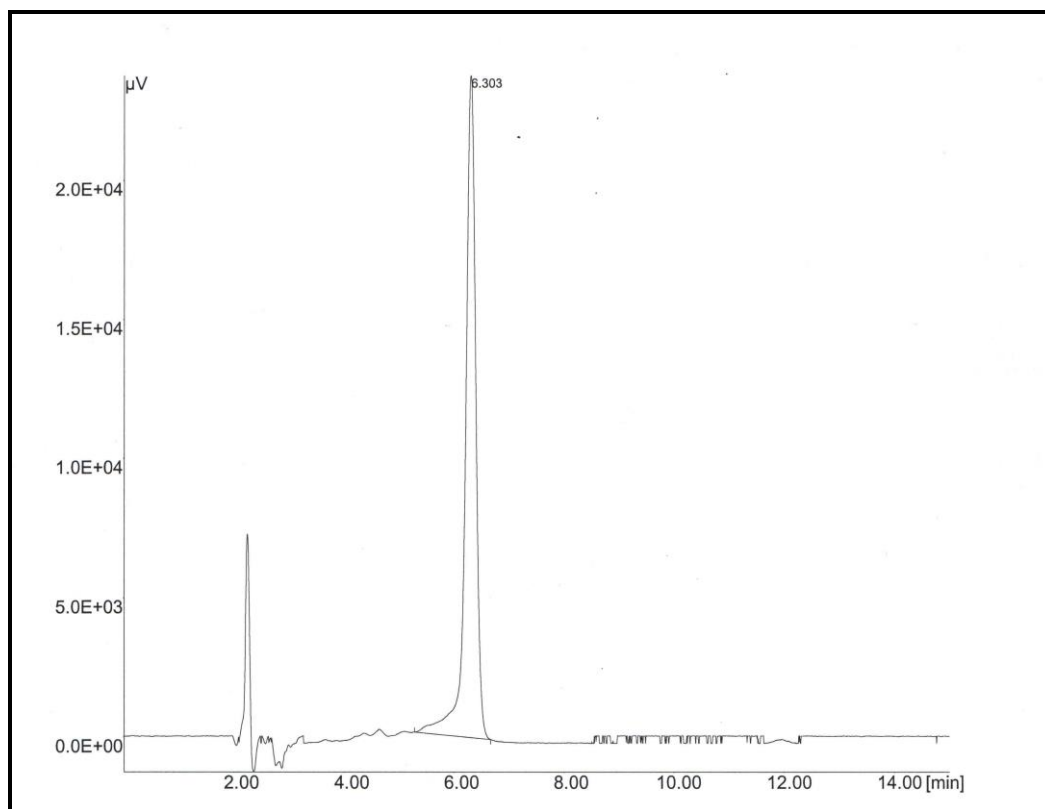


Figura 28. Cromatograma de una muestra patrón con una concentración 0,5 μg/ml de AmB.

Como se puede observar en el cromatograma anterior obtenemos una señal de AmB muy clara, con un tiempo de retención de 6,303 y sin ninguna interferencia.

Protocolo de análisis de las muestras biológicas

Las muestras a analizar son fragmentos de piel previamente sometidos a ensayos de difusión con distintas formulaciones de AmB. Dichos fragmentos que se corresponden con el área expuesta a la difusión, fueron congelados tras su recogida después de cada ensayo. Para el análisis de estas muestras se procedió de la siguiente manera:

1. Descongelación de las muestras contenidas en tubos Eppendorfs.
2. Trituración de las muestras biológicas con un pequeño mortero de vidrio adecuado para este recipiente.

3. PARTE TEÓRICA: Caracterización de las formulaciones

3. Añadir 0,25 ml de una mezcla metanol: agua (50:50) y volver a triturar.
4. Añadir 0,4 ml de acetonitrilo.
5. Mantener esta mezcla en vortex durante 1 min a velocidad máxima.
6. Dejar reposar en congelador durante 22-24 horas.
7. Al día siguiente, descongelar las muestras.
8. Agitar en vortex durante 1 min a velocidad máxima.
9. Centrifugar durante 10 min a 5000 rpm.
10. Filtrar el sobrenadante con un filtro Millipore Millex-HV Hydrophilic PVDF de 0,45 μm y analizar las muestras en HPLC, calculando la concentración de AmB a partir de los datos de la recta de calibración de los que se disponen.

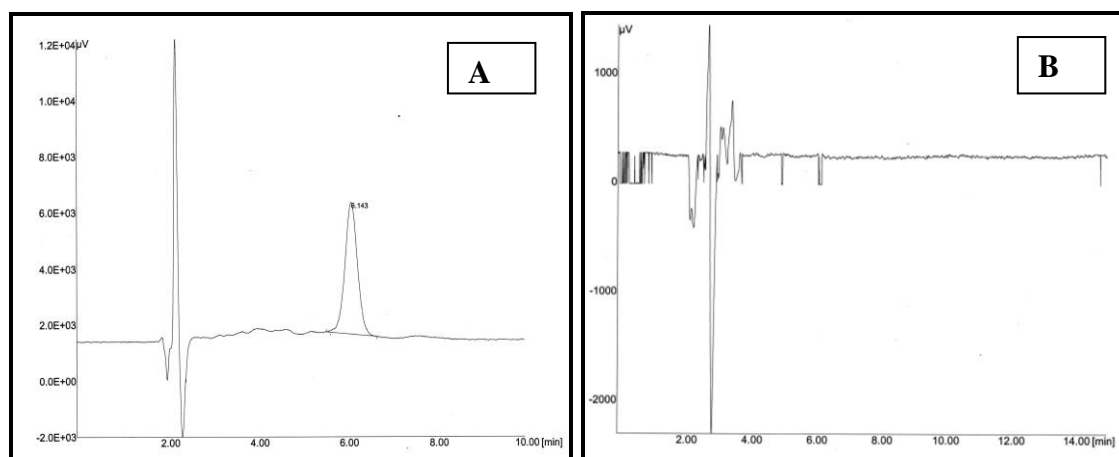


Figura 29. A) Cromatograma de una muestra biológica de piel de ratón sin pelo con AmB; B) Cromatograma de una muestra biológica de piel de ratón sin pelo sin AmB.

Como se observa aparece un pico de AmB con un tiempo de retención de 6,143 y no existen señales que interfieran en el dicho pico.

También se analizó el contenido de AmB existente en las muestras del compartimento donador, recogido en tubos Eppendorfs.

Protocolo de análisis de las muestras del compartimento receptor

1. Agitar en vortex durante 1 min a velocidad máxima.
2. Analizar las muestras en HPLC.

3.3.2 Caracterización reológica

3.3.2.1 Extensibilidad

La extensibilidad en formulaciones tópicas es crítica para su aceptación por parte del paciente, y está relacionada también con la eficacia terapéutica ya que permite poner en íntimo contacto con la piel la sustancia medicamentosa que vehicula la formulación (Suñé, *et al.*, 1967).

Suñé define el índice de extensibilidad como “el valor del área media que determina la pomada en 2 ensayos paralelos con 200 g de peso” (Buenestado, *et al.*, 1972).

El dispositivo de medida se denomina extensiómetro, y está formado por un tornillo micrométrico, una placa de metacrilato cuadrada con sistema de medida y un juego de pesas de 50, 100 y 200 g.

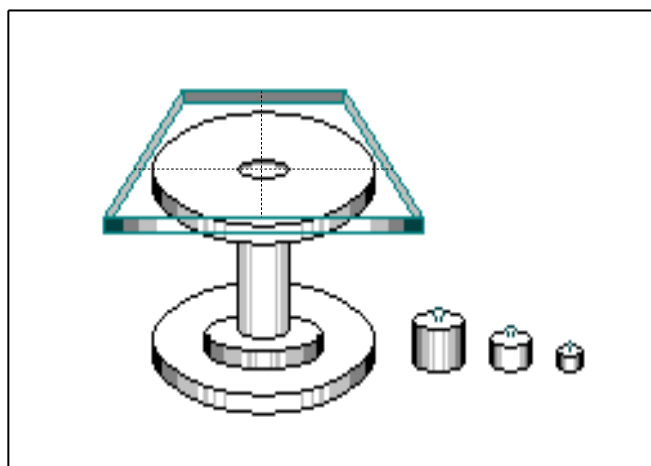


Figura 30. Extensiómetro de Pozo y Suñé.

Procedimiento

1. Disponer una cantidad de la formulación en el instrumento (aproximadamente 1 ml de pomada).

2. Colocar encima la placa graduada ($P = 28 \text{ g}$).
3. Lectura, en intervalos de 1 minuto desde la colocación de cada pesa, de las dimensiones alcanzadas por la fórmula al extenderse por la acción de los distintos pesos.
4. Se realizan todos los ensayos por triplicado.
5. Indicar la temperatura en cada ensayo, por estar este parámetro directamente relacionado con la reología de la formulación y por consiguiente con su extensibilidad.

Expresión de los resultados

La determinación de la superficie de la elipse descrita por la extensibilidad de la muestra ensayada se realiza aplicando la fórmula siguiente:

$$S(mm^2) = \pi \cdot \frac{d}{2} \cdot \frac{d'}{2} \quad (\text{Ec. 1})$$

siendo d y d' las dimensiones alcanzadas por la extensión de la muestra sobre las mediatrices graduadas.

La representación gráfica de la extensibilidad en función de los parámetros peso y superficie permite realizar un estudio comparativo del fenómeno extensiométrico entre las distintas muestras ensayadas (Buenestado, *et al.*, 1973) (Buenestado, *et al.*, 1973b).

La evaluación estadística de los datos obtenidos en los diferentes estudios se ha llevado a cabo mediante un paquete de programas estadísticos de ordenador: SIMFIT (Bardsley, 2001), que nos permitió realizar una medición lineal de los extensogramas y calcular el índice de extensibilidad y su intervalo de confianza para cada ensayo.

3.3.2.2 Viscosimetría

La reología estudia cómo se deforma y fluye la materia cuando se le somete a una presión. Ésta puede ser una tensión, compresión o una fuerza de cizalla. En general, los sistemas dispersos y coloidales se comportan de forma muy similar a los líquidos cuando son sometidos a una tensión o una compresión, pero su comportamiento es, en cambio, muy diferente cuando se les aplican fuerzas de cizalla.

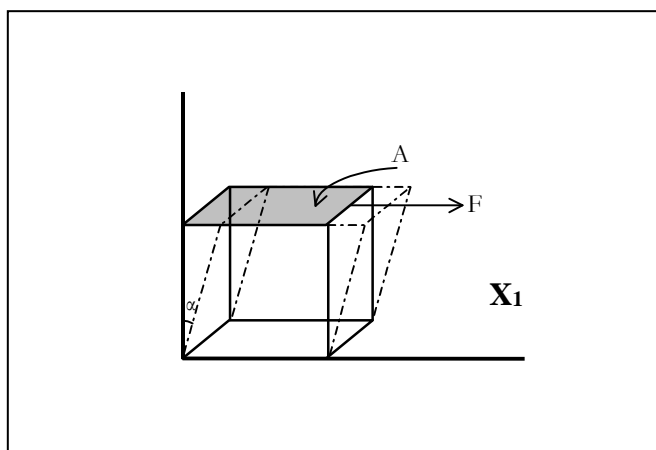


Figura 31. Aplicación de una fuerza de cizalla sobre un material.

La figura anterior representa un material sometido a una presión. La porción inferior del material se mantiene estacionaria, mientras que la superior es empujada con una fuerza F que actúa en la dirección x en un área A . Esta fuerza aplicada por unidad de área es lo que se llama **fuerza de cizalla** (S), y causará en el material una deformación (γ) = $\tan \alpha$. La **velocidad de cizalla** (D) es el gradiente de velocidad que se establece entre la capa inferior y la superior. La constante de proporcionalidad entre la fuerza de cizalla y la velocidad de cizalla es la **viscosidad** (η). De esta forma tendremos:

$$S = \frac{F}{A} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$D = \frac{\delta \gamma}{\delta t} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$\eta = \frac{S}{D} \quad (\text{Ec. 4})$$

Una vez que la fuerza haya cesado, pueden darse las siguientes situaciones:

- Que el material retorne a su forma original → Comportamiento elástico.
- Que permanezca en la nueva posición → Comportamiento plástico.

Cuando la deformación sigue una relación lineal con la fuerza de cizalla, hablamos de Fluidos Newtonianos, comportamiento típico de soluciones y suspensiones acuosas diluidas.

1. SÓLIDOS IDEALES

Cuando una fuerza de estiramiento (tensión) se aplica sobre un sólido ideal, la magnitud del estiramiento o deformación producida es proporcional a la tensión aplicada. Este fenómeno se conoce como la *Ley de Hooke*, y la constante de proporcionalidad se denomina módulo de cizalla. Una vez que cesa la fuerza, la energía acumulada en forma de energía elástica se libera y el cuerpo recupera inmediatamente su forma inicial.

2. FLUIDOS NEWTONIANOS

Cuando se aplica una fuerza sobre un fluido newtoniano, éste se deforma con una velocidad proporcional a la fuerza aplicada y fluye. Una vez que cesa la fuerza, el material no recupera su forma original. Esto se debe a que la energía se habrá disipado como calor para vencer la energía interna que se oponía al flujo. En el caso de líquidos newtonianos, la viscosidad del líquido es una constante, de modo que el material se comporta de acuerdo a la *Ley de Newton* (Ec. 4). Si representamos la fuerza de cizalla ejercida (S) frente a la velocidad de cizalla (D), se obtiene una línea recta de pendiente α constante, que representa la viscosidad del sistema.

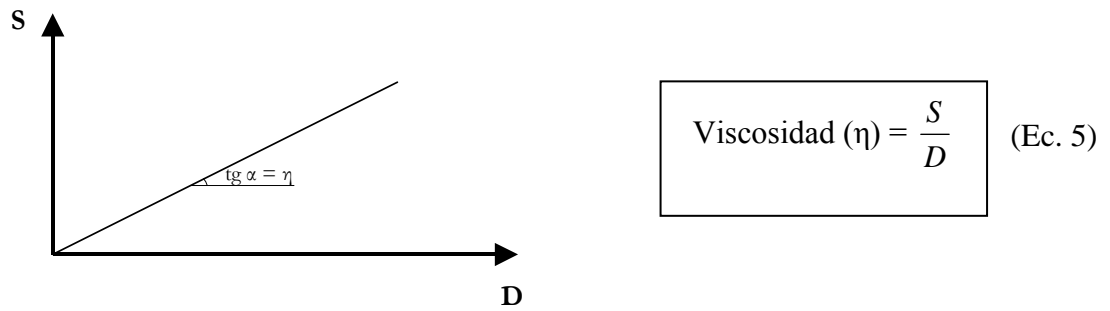


Figura 32. Viscosidad en fluidos newtonianos.

3. FLUIDOS NO NEWTONIANOS

Estos fluidos no siguen la Ley de Newton, y su viscosidad no permanece constante sino que varía con la velocidad de cizalla aplicada. Así no podemos hablar en este caso de la viscosidad como una constante característica del material, sino que nos referiremos a una viscosidad diferencial $\left(\frac{\delta S}{\delta \gamma}\right)$, que se corresponde con la pendiente de la tangente de la curva que se obtiene al representar la fuerza de cizalla ejercida (S) frente a la velocidad de cizalla (D), en cada punto.

Existen varios tipos de comportamiento no newtoniano en función del tipo de desviación observada con respecto a la Ley de Newton:

- *Comportamiento plástico*

Este tipo de materiales se comportan como un sólido (elástico), es decir, no fluyen hasta que se alcanza una determinada fuerza de cizalla umbral (S_0) que se conoce como fuerza de ruptura. A partir de ahí, el material fluye y se comporta como un fluido newtoniano. La viscosidad se denomina viscosidad plástica (η_p) y se calcula a partir de la ecuación 6:

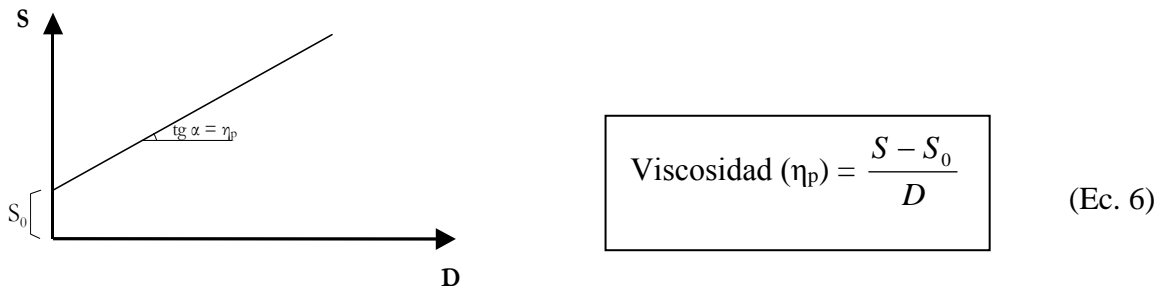


Figura 33. Viscosidad en materiales plásticos.

- *Comportamiento pseudoplástico*

Cuando un material posee un valor de ruptura (S_0) tan bajo que no es apreciable, y su viscosidad diferencial disminuye con la fuerza de cizalla, se dice que tiene un comportamiento pseudoplástico. La viscosidad aparente se calcula a partir de la tangente a la curva obtenida en cada punto. La mejor forma de describir el sistema será pues a través del reograma completo.

- *Comportamiento dilatante*

Cuando un sistema formado por partículas sólidas dispersas en un líquido a una elevada concentración es sometido a una fuerza, puede experimentar un aumento aparente en su volumen o dilatación. Al aumentar la velocidad de cizalla, aumenta de la resistencia a la cizalla, esto es, la viscosidad. Este tipo de fluidos tienen un comportamiento dilatante, y el incremento en la viscosidad se denomina dilatación reológica. La viscosidad aparente se calcula también en este caso a partir de la tangente a la curva obtenida en cada punto.

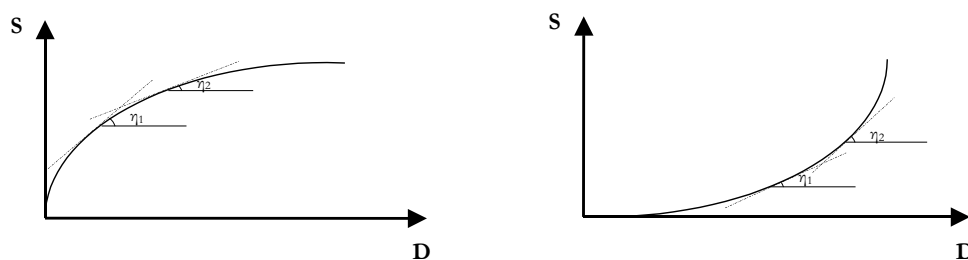


Figura 34. Viscosidad en materiales pseudoplásticos y dilatantes, respectivamente.

4. COMPORTAMIENTO TIEMPO-DEPENDIENTE

Este tipo de comportamiento es característico de materiales cuya viscosidad no sólo depende de la velocidad de cizalla, sino también del tiempo durante el que han sido sometidos a la fuerza de cizalla. Cuando un sistema en equilibrio se somete a un cambio repentino en las condiciones externas, las partículas tardan cierto tiempo en adaptarse a ellas. De la misma manera, aunque un sistema sea reversible y pueda recuperar su estructura inicial una vez que se haya cesado de aplicar una fuerza, esta recuperación requerirá también cierto tiempo. Este fenómeno se denomina *tixotropía*, y se detecta a partir de reogramas con un ciclo de subida en el que se va aumentando la fuerza de cizalla, y uno de bajada en el que se va disminuyendo. Si las curvas obtenidas en cada dirección son diferentes, se obtiene un ciclo de histéresis. El área englobada en este ciclo es representativo de la facilidad de reestructuración del sistema.

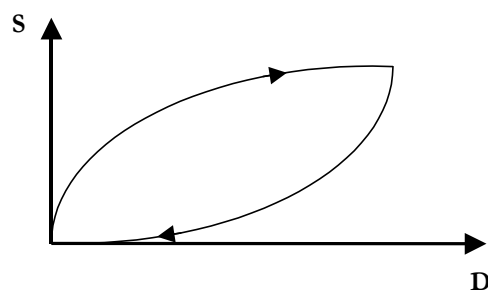


Figura 35. Viscosidad en materiales tixotrópicos.

5. VISCOELASTICIDAD

Cuando un material sobre el que se ejerce una fuerza almacena parte de la energía como energía elástica (elasticidad) mientras que otra parte se disipa como calor (viscosidad), se dice que actúa como viscoelástico.

Procedimiento

Los estudios de reología de los geles estudiados se llevaron a cabo en un viscosímetro geométrico de cono y placa Brookfield modelo HB con aguja CP52, provisto de un baño de recirculación termorregulado conectado a la placa donde se deposita la muestra. Se determinó la viscosidad (η) y fuerza de cizalla (D) de las muestras a una temperatura constante de $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$. Las medidas se efectuaron a una velocidad de cizalla establecida entre 0 y 30 s^{-1} con una rampa de velocidad controlada de 15 s, y entre 30 y 0 s^{-1} con la misma rampa de velocidad.

Expresión de resultados

Los datos obtenidos se ordenan en tablas (torsión, viscosidad, fuerza de cizalla, velocidad de cizalla). Posteriormente, se representa gráficamente la fuerza de cizalla frente a la velocidad de cizalla (reogramas).



Figura 36. Viscosímetro Brookfield modelo HB con aguja CP52.

3.3.3 Estudios de difusión *ex-vivo*

3.3.3.1 Planteamiento general de los estudios de difusión *ex-vivo*

Existe un interés creciente en el estudio de la penetración de principios activos a través de la piel debido principalmente al desarrollo de las vías tópica y transdérmica como alternativas a los métodos tradicionales de administración de fármacos, y la valoración del riesgo y toxicidad de un amplio rango de compuestos potencialmente peligrosos y sus implicaciones en el uso doméstico y en los sectores agroquímico, químico, cosmético y farmacéutico. La necesidad de datos relevantes obtenidos bajo condiciones reproducibles y seguras han originado un desarrollo y estandarización de los métodos tanto *in vivo* y *ex vivo* como *in vitro* (Brain, *et al.*, 1998).

El procedimiento más utilizado en la evaluación de la absorción percutánea de fármacos es el diseño de estudios *in vitro* mediante la utilización de celdas de difusión (Bronaugh, 1989), (Schaefer, *et al.*, 1996d), (Brain, *et al.*, 1998), (Jiang, *et al.*, 1998). En este tipo de ensayos se consigue un control de las condiciones experimentales de una manera precisa, siendo las únicas variables la piel y el compuesto a estudiar (Brain, *et al.*, 1998). La simplicidad de la metodología de los experimentos permite la realización, de un gran número de ensayos con menos esfuerzo, (Bronaugh, 1989). Además, la metodología *in vitro*, proporciona información esencial adicional frente a las investigaciones *in vivo* sobre la velocidad de absorción de los compuestos directamente debajo de la membrana a estudiar (Bronaugh, 1989), (Brain, *et al.*, 1998), y lleva a cabo estimaciones del metabolismo cutáneo siempre que se mantenga la viabilidad de la piel a lo largo del experimento (Bronaugh, 1989), (Schaefer, *et al.*, 1996d), (Brain, *et al.*, 1998). También, proporciona información sobre la penetración y distribución del principio activo en las capas de la piel (Touitou, *et al.*, 1998), permite el estudio de sustancias potencialmente nocivas utilizando piel humana (Bronaugh, 1989), (Brain, *et al.*, 1998), (Schaefer, *et al.*, 1996e), y se han utilizado extensamente en trabajos que establecen una correlación entre las características estructurales de los compuestos y su permeabilidad a través de la membrana (Durrheim, *et al.*, 1980), (Schaefer, *et al.*, 1996d).

Tipos de celdas de difusión

Una celda de difusión con un diseño correcto debe reunir una serie de características (Brain, *et al.*, 1998):

- Estar fabricada a partir de materiales inertes.
- Resistencia mecánica.
- Fácil manejo.
- Permitir el uso de membranas de distinto grosor.
- Proporcionar una buena homogeneización del medio en el compartimento receptor.
- Asegurar un contacto total entre la membrana y la fase receptora evitando la presencia de burbujas de aire, etc.
- Mantener una temperatura constante y controlable.
- Poseer volúmenes y áreas de difusión calibrados de una manera precisa.
- Ser capaz de mantener la integridad de la piel, a lo largo del ensayo.
- Tener la posibilidad de muestreo sencillo y, si es posible, automatizable.
- Disponibilidad de la celda a un coste razonable.

Existen diversos tipos de celdas de difusión agrupadas como celdas estáticas o celdas dinámicas. Entre el compartimento donador y el compartimento receptor, se coloca una membrana bien de origen sintético o de origen natural.

- Celdas de difusión estáticas

Celdas horizontales

Están constituidas por dos cámaras dispuestas horizontalmente, una de las cuales contiene el componente que va a absorberse y la otra el medio receptor. Las dos cámaras se encuentran separadas por una membrana. El contenido de una o de ambas cámaras puede ser agitado para asegurar la adecuada dispersión de las moléculas de fármaco y minimizar la difusión estática de las capas limitantes. El control de la temperatura se efectúa introduciendo todo el montaje en un baño de agua termostatzado.

Este tipo de celdas consideran con exactitud los principios de la difusión según los cuales el compuesto en cuestión difunde a través de la correspondiente membrana desde el compartimento donador (en solución) al receptor (misma solución) manteniéndose en agitación ambas soluciones. La concentración del compuesto en el compartimento donador no disminuye significativamente a lo largo del experimento. La aplicación de este diseño es importante en aquellos estudios donde es relevante el establecimiento del estado estacionario. Se provoca una excesiva hidratación del estrato córneo y consecuentemente, una disminución de la función de barrera del mismo (Durrheim, *et al.*, 1980), (Bronaugh, *et al.*, 1985), (Bronaugh, 1989), (Schaefer, *et al.*, 1996d), (Brain, *et al.*, 1998).

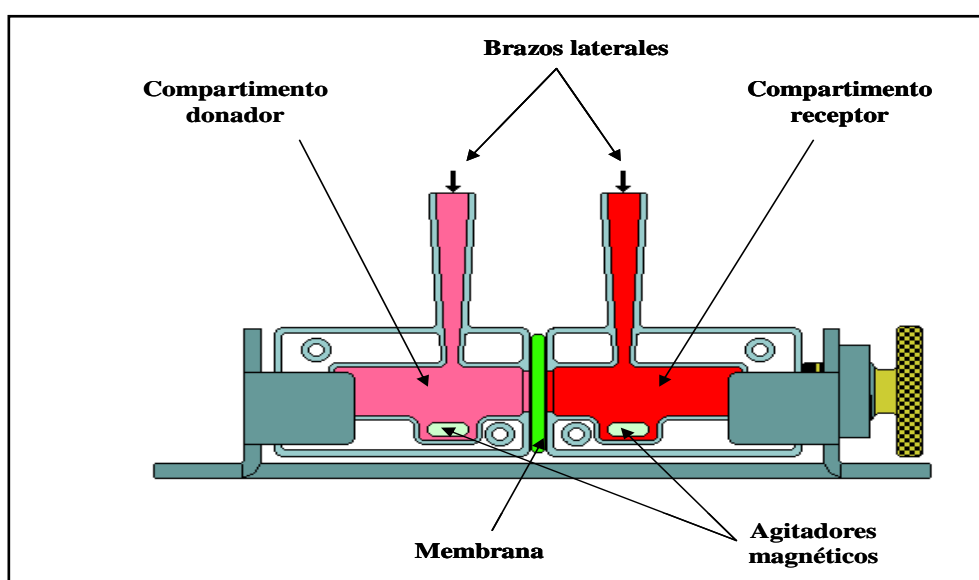


Figura 37. Diseño celda horizontal (Gutiérrez, 2011).

Celdas verticales

Durante los últimos años se han diseñado y estudiado diferentes modelos de celdas verticales. La celda de difusión de Franz es una de las más empleadas para estudiar la absorción en piel simulando las condiciones *in vivo*, Franz (Franz, 1975) diseñó una celda de difusión estática que se asemejaba a esta situación. Mediante este procedimiento, la piel por su lado epidérmico está expuesta a las condiciones ambientales y, por su lado dérmico, bañada por un fluido receptor en continua agitación

dispuesto en un recipiente debajo de la piel (compartimento receptor), a partir del cual, se retiran alícuotas cuyo análisis permite la monitorización de la absorción de los compuestos que han atravesado la membrana (Bronaugh, *et al.*, 1985) (Bronaugh, 1989) (Schaefer, *et al.*, 1996d) (Brain, *et al.*, 1998).

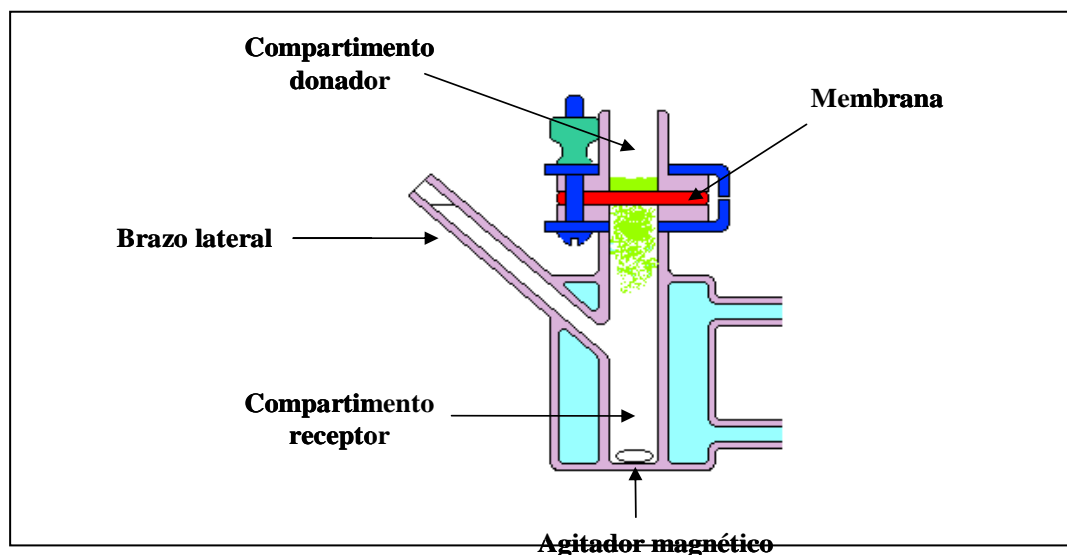


Figura 38. Diseño celda de Franz (Gutiérrez, 2011).

- Celdas de difusión dinámicas:

La celda de difusión de flujo continuo (Bronaugh, *et al.*, 1985) es otro tipo de celda de difusión vertical. El medio receptor fluye bajo la piel (lado de la dermis) recogiendo el material penetrado a través de la membrana al compartimento receptor y depositándolo en viales colocados en un colector de fracciones. Dentro de la cámara receptora existe una apropiada agitación al crearse una ligera presión de retorno cuando el fluido es forzado a salir por la pequeña conexión de salida, situación que además asegura un contacto íntimo del fluido con la piel. Este diseño de celda presenta una serie de ventajas de entre las que destacan (Bronaugh, *et al.*, 1985), (Bronaugh, 1989), (Schaefer, *et al.*, 1996d), (Brain, *et al.*, 1998), (Bronaugh, *et al.*, 1999):

- Facilidad de automatización.

- Mantenimiento de las condiciones sumidero imitando más fielmente las condiciones *in vivo*.
- Distribución de los compuestos hidrófobos desde la piel al compartimento receptor de una manera más fisiológica, debido al continuo reemplazamiento de fluido receptor.
- Posibilidad de mantener más fácilmente la viabilidad de la piel en experimentos de larga duración, usando soluciones fisiológicas como fluido receptor que se renueva constantemente.

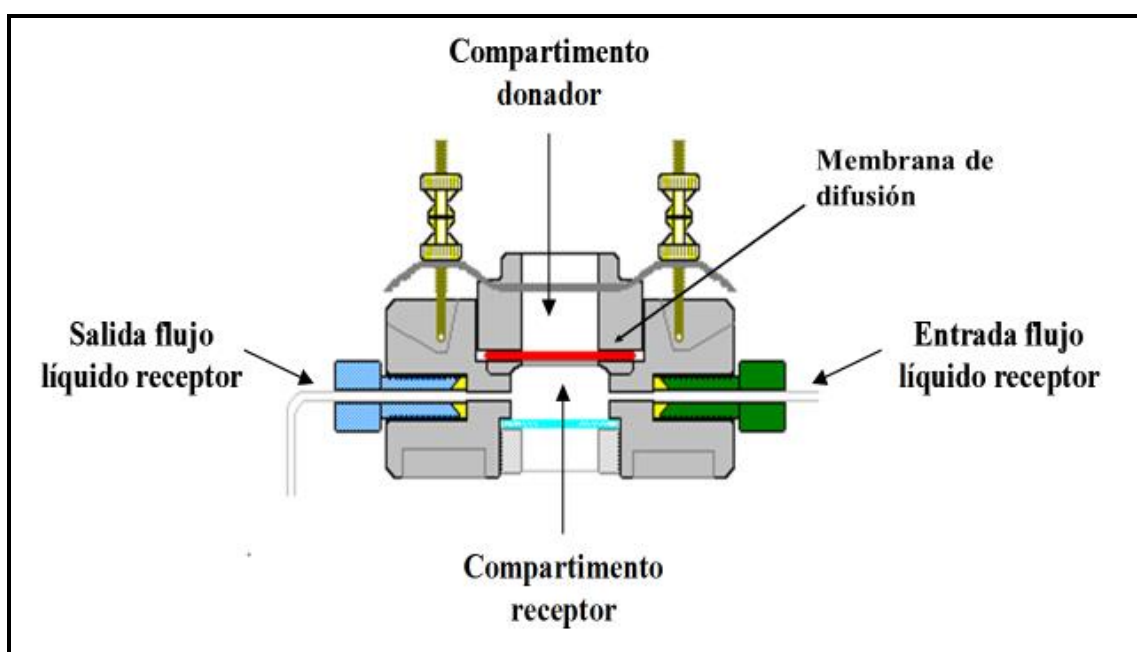


Figura 39. Diseño celda de difusión de flujo continuo (Gutiérrez, 2011).

El fluido receptor ideal debe proporcionar una simulación exacta de las condiciones de penetración *in vivo* del compuesto a estudiar. Como regla general, la concentración del compuesto en el fluido receptor no debe exceder el 10 % de la solubilidad máxima a la temperatura de trabajo (condiciones “shink” o sumidero); una excesiva concentración en la fase receptora conduciría a una disminución en la velocidad de absorción. En la elección del fluido receptor hay que tener en cuenta la posibilidad de interferencia con la barrera de la piel. Cualquier solución amortiguadora fosfato salina a un pH =7,4 es el líquido más comúnmente utilizado aunque, como se indica a continuación, no es siempre la elección más apropiada. Se ha determinado que

en compuestos con una solubilidad en agua $< 10 \mu\text{g/ml}$, puede ser necesario la adición de co-solventes. Con el fin de inhibir el crecimiento microbiano se pueden añadir agentes antibacterianos al líquido receptor. Si se pretende mantener la viabilidad de la piel, el compartimento receptor debe contener una solución fisiológica con adecuadas proporciones de nutrientes (Bronaugh, 1989), (Brain, *et al.*, 1998), (Bronaugh, *et al.*, 1999).

Existen distintas variables de trabajo en los experimentos de difusión *in vitro* que se resumen a continuación.

Tipos de membranas

Es la variable más importante. Se recomienda el uso de piel humana en este tipo de experimentos evitando la extrapolación de datos desde un modelo animal, sin embargo, y debido principalmente a las dificultades de su obtención, se sustituye frecuentemente por piel de origen animal (Bronaugh, 1989) (Brain, *et al.*, 1998). No existe ningún modelo animal que se asemeje completamente a la piel humana (Durrheim, *et al.*, 1980), presentando el estrato córneo humano características únicas en cuanto a su grosor y densidad folicular (Bronaugh, 1989). El origen de este tipo de piel en los ensayos de difusión *in vitro* es, generalmente, procedente de autopsia de cadáver (dentro de las 24 horas de la muerte del donador) o quirúrgico (Schaefer, *et al.*, 1996d). Sin entrar a considerar la variabilidad interindividual, la piel de un mismo individuo presenta considerables diferencias en las distintas regiones anatómicas. Por ello se suele seleccionar la piel abdominal y del pecho como representativo de la piel total, ya que la superficie de las áreas que presentan mayor permeabilidad son pequeñas (escroto, frente, área detrás de la oreja), mientras que las áreas con menor permeabilidad (espalda, extremidades) son mayores (Schaefer, *et al.*, 1996c).

Las pieles de mamíferos sin pelo son utilizadas como posibles aproximaciones por las similitudes que presentan a la piel humana en la escasa distribución de pelo y en las características de la epidermis. El ratón sin pelo es una de las especies más usadas como alternativa al uso de piel humana (Durrheim, *et al.*, 1980), (Bond, *et al.*, 1988) en los ensayos de difusión *in vitro* al ser un animal pequeño, cuya piel dorsal y abdominal, al no encontrarse adherida a las vísceras, permite retirar la membrana con un grosor uniforme siendo fácil su manejo. Un modelo de piel adecuado debe ser al menos

cualitativamente, e idealmente cuantitativamente similar a la barrera que presenta la piel humana, comportamiento que algunos autores (Durrheim, *et al.*, 1980) comprobaron en los estudios de permeabilidad de diversas moléculas a través de piel de ratón sin pelo.

Obtención y preparación de la piel

Dentro de la metodología *in vitro* la preparación de la piel es un paso crítico y se pueden emplear diferentes métodos (Brain, *et al.*, 1998) de acuerdo a factores como la naturaleza fisicoquímica de los agentes a penetrar, los datos que se quieren obtener o la disponibilidad del tejido. Se puede utilizar piel completa, piel a la que se le ha retirado el tejido subcutáneo, membranas epidérmicas obtenidas por tratamiento por calor compuestas de estrato córneo y epidermis viable, membranas de estrato córneo cuya obtención requiere tratamiento enzimático. Sin embargo, la preparación de secciones cutáneas requiere tiempo y aumenta la posibilidad de dañar la membrana, motivos, que inducen a valorar las razones de no usar piel completa.

Otro aspecto a tener en cuenta es el de comprobación de la integridad de la piel. Esta puede realizarse de una manera cualitativa por simple examen visual y de una manera cuantitativa a través de diversos parámetros como la determinación de la constante de permeabilidad del agua (Bronaugh, *et al.*, 1986) (Schaefer, *et al.*, 1996d) (Brain, *et al.*, 1998), el porcentaje de agua absorbida en un período determinado (Bronaugh, *et al.*, 1986), la medida de la pérdida del agua transepidérmica (TEWL) (Schaefer, *et al.*, 1996d), y la determinación de la resistencia de la piel al paso de iones (Trottet, *et al.*, 2005).

Dado que la disponibilidad que presenta la piel humana no permite utilizar piel fresca a menudo, es necesario desarrollar un método de almacenamiento adecuado (Babu, *et al.*, 2003). La congelación, puede no solo eliminar la viabilidad del tejido sino inducir alteraciones fisicoquímicas en la membrana (Durrheim, *et al.*, 1980), (Bronaugh, *et al.*, 1986). En este sentido Webster y colaboradores desarrollaron un método para mantener la viabilidad de la piel humana y sus características por períodos de hasta 8 días (Wester, *et al.*, 1998). Estos autores demostraron la viabilidad del tejido tras su conservación durante el tiempo señalado, manteniendo la piel a 4 °C sumergida en Medio mínimo esencial de Eagles isotónico con sal de Earle (MEM-EBSS) conteniendo gentamicina como agente bacteriostático.

Debido a los problemas de disponibilidad, variabilidad, etc que provoca la utilización de piel natural (de origen humano o animal), se plantea en diversos estudios la utilización de membranas sintéticas artificiales. En este sentido se han evaluado diversos tipos de membranas como modelos en estudios de absorción percutánea, ofreciendo la posibilidad de proporcionar un sistema menos variable. Las membranas de polidimetilsiloxano (PDMS) (elastómero no poroso, apolar y amorfo a temperatura ambiente con unas características de solubilidad cercanas a las del hexano) constituyen una barrera hidrófoba, no porosa, inerte y reproducible. Además requieren unas condiciones de manejo menos estrictas y pueden ser obtenidas en una variedad de formas y grosores presentando una lipofilia similar a la del estrato córneo (Twist, *et al.*, 1989) (Brain, *et al.*, 1998).

Temperatura de trabajo

Los experimentos de difusión *in vitro* se llevan a cabo normalmente manteniendo una temperatura superficial de la piel de 32 °C (valor *in vivo*) (Schaefer, *et al.*, 1996d), (Brain, *et al.*, 1998). Estas condiciones se consiguen atemperando la solución receptora (Franz, 1975), sumergiendo las celdas en un baño de agua (Durrheim, *et al.*, 1980) o perfundiendo agua a una determinada temperatura a través de un sistema de termostatación que cubre la celda (Bronaugh, *et al.*, 1985). Es necesario validar qué temperatura de trabajo debe seleccionarse en cada equipo para garantizar una temperatura en la superficie de la membrana de 32 °C (Córdoba-Díaz, *et al.*, 2000).

Procedimiento de aplicación del principio activo

La manera en la que se aplica una sustancia sobre la superficie de la piel puede ser determinante en su posterior absorción. Deben considerarse diversos factores en la selección de un procedimiento adecuado, como: la naturaleza del vehículo, la concentración del principio activo, la cantidad de formulación aplicada, el mecanismo de aplicación, el tiempo de exposición y el sistema para retirar el vehículo aplicado, si es necesario (Brain, *et al.*, 1998).

En función de la de la dosis de principio activo aplicada, podemos hablar de sistemas con dosis finitas o con dosis infinitas. En un experimento con dosis finitas, se aplica una cantidad determinada de formulación mimetizando las condiciones “en uso”

(Schaefer, *et al.*, 1996d) (Brain, *et al.*, 1998). Estas condiciones permiten la evaporación de los constituyentes volátiles de la formulación aumentando las concentraciones relativas del vehículo residual en la superficie de la piel al igual que sucede bajo condiciones reales, *in vivo* (Schaefer, *et al.*, 1996d). A su vez, durante el experimento podría existir una marcada disminución de la dosis en el compartimento donador (Brain, *et al.*, 1998).

Cuando se trabaja a dosis infinitas, se dispone una cantidad suficiente de compuesto sobre la piel de modo que no exista, prácticamente, cambios en la concentración del compartimento donador durante el experimento (Brain, *et al.*, 1998). Debido a la gran cantidad de formulación aplicada se produce una oclusión de la piel siendo la evaporación de la muestra insignificante y creando condiciones no fisiológicas con velocidades de absorción exacerbadas (Schaefer, *et al.*, 1996d). Es un método apropiado si dentro de los objetivos experimentales se incluye el cálculo de parámetros de difusión, como el coeficiente de permeabilidad, o la investigación de mecanismos promotores de la penetración (Brain, *et al.*, 1998).

Tiempo de duración del experimento

Aunque algunos autores han extendido la duración de los experimentos de difusión *in vitro* hasta 120 horas se recomienda que se limiten a 24 o 48 horas. En ensayos realizados con dosis infinitas, 48 horas puede ser un tiempo corto para establecerse un estado estacionario pudiéndose alargar hasta 72 horas en tales casos (en presencia de agentes antimicrobianos) según la ECVAM (Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos). Los investigadores deben conocer la posible degradación de la piel por encima de los periodos de tiempo estructurados (Brain, *et al.*, 1998).

Intervalo de muestreo en el compartimento receptor

En aquellos experimentos en los que la finalidad principal radica en la determinación de la cantidad total absorbida de un principio activo en el compartimento receptor, únicamente es necesario tomar una muestra al finalizar el experimento (Franz, 1975). Por el contrario, se establecen intervalos frecuentes de muestreo a lo largo de toda la experiencia cuando se quiere determinar parámetros de la difusión como por

ejemplo el flujo, el tiempo de latencia, el estado estacionario (Franz, 1975), (Brain, *et al.*, 1998).

Método de cuantificación del principio activo

A lo largo de los años se han ido desarrollando diversos métodos para la cuantificación de los principios activos en piel como son las técnicas de extracción, sección horizontal en láminas, stripping, retirada de los folículos pilosos, autoradiografía cuantitativa y métodos espectroscópicos (Touitou, *et al.*, 1998). Todos estos métodos presentan sus ventajas e inconvenientes, en función de su mayor o menor accesibilidad, coste y rapidez en el desarrollo que detallamos a continuación.

Las medidas de cuantificación de principio activo a partir de su extracción en piel representa una fácil y rápida metodología que requiere un solvente adecuado y la aplicación de una técnica analítica sensible, como HPLC, que permita su cuantificación. La desventaja de este método es que no proporciona ninguna información sobre la localización del principio activo dentro de la piel (Touitou, *et al.*, 1998).

En cuanto a la sección horizontal de la piel en láminas esta se realiza mediante un criotomo, seccionándose paralelamente a la superficie en láminas y determinándose a través de una técnica analítica adecuada, la cantidad de principio activo en cada una de ellas. Entre los inconvenientes de esta técnica destacan la no diferenciación entre epidermis o dermis en las ondulaciones en la unión dermoepidérmica, así como la falta de datos sobre la concentración de principio activo en las unidades pilosebáceas (Touitou, *et al.*, 1998).

Número de réplicas

La recomendación más ampliamente citada respecto al número de réplicas realizadas en los estudios de difusión *in vitro* son doce, aunque se podría emplear un número menor si el coste, tiempo, o biodisponibilidad de las pieles supusiese un problema (Brain, *et al.*, 1998).

Mecanismos que rigen el proceso de difusión

La creencia de que el proceso de transporte a través de la piel de distintos compuestos se controla por mecanismos de difusión pasiva hace posible aplicar la leyes de difusión de Fick (Guy, *et al.*, 1989) (Hadgraft, 2001). El modelo matemático aplicado a los procesos de difusión considera cada capa de piel homogénea asumiéndose una función de barrera constante en cada una de ellas, y el establecimiento de un reparto del principio activo entre los distintos estratos (Guy, *et al.*, 1989).

Primera Ley de Fick

La manera más sencilla de estudiar un proceso de absorción *in vitro* consiste en aplicar la primera ley de Fick la cual, podría ser una aproximación válida en algunos experimentos *in vitro*. Sin embargo, el estrato córneo es una barrera muy impermeable y por lo tanto, se requiere un largo tiempo para establecer las condiciones de estado estacionario (requisito para aplicar la primera ley de Fick), siendo improbable que se alcance en una aplicación terapéutica o cosmética. Por otra parte, este tipo estudios *in vitro* permite un análisis general del fenómeno. El flujo de un compuesto a través del estrato córneo, membrana que se corresponde generalmente con el paso limitante a la difusión, puede ser descrito de forma simplificada a través de la primera ley de Fick mediante la ecuación:

$$\boxed{\frac{dQ}{dt} = \frac{DKC}{h}} \quad (\text{Ec. 7})$$

donde dQ/dt es la velocidad de penetración en piel (flujo (J)), D es el coeficiente de difusión del principio activo en el estrato córneo, K es el coeficiente de reparto del compuesto entre la piel y el vehículo, C es la concentración del principio activo en el vehículo (se asume que la concentración del compuesto en la fase receptora es cero) y h es la longitud de camino difundido. Esta ecuación solo es válida en condiciones de estado estacionario y siempre que no existan interacciones significativas entre la sustancia activa y los componentes de la piel (Guy, *et al.*, 1989) (Barry, 2001), (Hadgraft, 2001) (Moser, *et al.*, 2001).

Los parámetros fisicoquímicos principales que controlan la difusión de xenobióticos a través de la piel son: el coeficiente de reparto, el coeficiente de difusión y la solubilidad. No es fácil separar los valores de K y D, y el cálculo de su magnitud depende de h, que debido a la imprecisión que existe en la determinación de la tortuosidad de los canales intercelulares, no puede ser estimada de una manera correcta. Estas tres variables son agrupadas como una constante heterogénea denominada coeficiente de permeabilidad $K_p (= KD/h)$ quedando la Ec. 7 simplificada de la siguiente forma (Hadgraft, 2001):

$$\boxed{\frac{dQ}{dt} = J = K_p C} \quad (\text{Ec. 8})$$

En función del fundamento matemático del proceso, existen una serie de parámetros que pueden ser utilizados en el desarrollo y optimización de una formulación dérmica desde el punto de vista teórico. Así, cambios en las características de una formulación pueden provocar modificaciones en las variables D, K y C que se relacionan entre sí según la Ec. 7, siendo estos parámetros, fundamentales a la hora de diseñar una formulación que busque una optimización de la penetración en piel de los principios activos (Guy, *et al.*, 1989). Un aumento de la difusión y solubilidad del principio activo en el estrato córneo, y un aumento del grado de saturación del compuesto en el vehículo (referido a la concentración de principio activo disuelto en el vehículo respecto a la solubilidad del principio activo en dicho vehículo) son estrategias, basadas en la primera ley de Fick, cuyo objetivo es conseguir una mayor penetración en piel. La última estrategia está fundamentada en la interacción entre el principio activo y el vehículo, en cambio, las dos primeras, implican un efecto del vehículo en la función de barrera del estrato córneo (Moser, *et al.*, 2001).

Segunda ley de Fick

Como antes se ha mencionado, es difícil que se lleguen a alcanzar las condiciones de estado estacionario en ensayos de difusión de principios activos, principalmente cuando se mimetizan las condiciones *in vivo*, siendo necesario aplicar la

segunda ley de difusión de Fick para analizar los perfiles de flujo y concentración bajo estas condiciones. Esta 2ª ley de Fick se rige por la siguiente expresión general:

$$\boxed{\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}} \quad (\text{Ec. 9})$$

donde dC/dt es la velocidad de difusión, D es el coeficiente de difusión, x es la distancia a través de la piel y dC es el gradiente de concentración del principio activo a ambos lados de la membrana. Diversos autores han aplicado un modelo matemático a un experimento de difusión *in vitro* basados en la 2ª ley de Fick (Parry, *et al.*, 1990) (Harrison, *et al.*, 1995) (Coceani, *et al.*, 2003). Desarrollaron un modelo de difusión transdérmica en celdas de difusión de flujo continuo basado en una membrana constituida por dos capas, la primera capa se corresponde con el estrato córneo y la segunda capa con la epidermis viable- dermis. Cada capa se consideró homogénea y se caracterizó por un coeficiente de difusión efectivo que representa el transporte por todas las rutas de penetración y un coeficiente aparente de reparto que representa la absorción total del compuesto en todas las regiones dentro de cada capa de piel (Harrison, *et al.*, 1995). El modelo matemático referido se encuentra resumido en la Tabla 17.

Difusión en la membrana	
$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{ei} \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2}$ <p>cuando $x = 0$, $C_1 = K_1 C_{don}$</p> <p>cuando $x = h$, $C_2 = K_2 C_{rec}$</p>	
<p>Bicapa: Flujo que sale de la capa 1 debe equilibrarse con el flujo que entra en la capa 2</p> $D_{e1} \frac{dC_1}{dx} = D_{e2} \frac{dC_2}{dx}$ <p>cuando $t = 0$, $C_1 = C_2 = 0$</p>	
Balance de masas en compartimento donador	Balance de masas en compartimento receptor
$\frac{\partial C_{don}}{\partial t} = \frac{A}{V_{don}} D_{e1} \frac{\partial C_1}{\partial x} \Big _{x=0}$ <p>Cuando $t = 0$, $C_{don} = C_{don'}$</p>	$\frac{\partial C_{rec}}{\partial t} = \frac{A}{V_{rec}} D_{e2} \frac{\partial C_2}{\partial x} \Big _{x=h} - \frac{F_{rec}}{V_{rec}} C_{rec}$ <p>Cuando $t = 0$, $C_{rec} = 0$</p>

Tabla 17. Descripción matemática del estado no estacionario en un experimento de difusión in vitro en celdas de difusión de flujo continuo.

C: concentración del principio activo en una capa de la piel **i**. **x**: distancia a través de la piel. **h**: espesor efectivo de la piel. **D_e**: coeficiente de difusión efectivo. **K**: coeficiente de reparto aparente. **A**: área de piel disponible en la difusión. **V**: volumen del compartimento. **F_{rec}**: Flujo del líquido receptor a través de la cámara receptora. **1** se refiere a la capa de la piel constituida por el estrato córneo. **2** se refiere a la capa de la piel constituida por la epidermis viable-dermis. **don** se refiere a donador. **rec** se refiere a receptor.

El flujo intrínseco al compartimento receptor se determina a partir de la expresión (Harrison, *et al.*, 1995):

$$J_{intrin} = -D_e \frac{\partial C_2}{\partial X} \text{ x=h} \quad (\text{Ec. 10})$$

El balance general de masas en el compartimento receptor de una celda de difusión de flujo continuo (celda de difusión utilizada en el trabajo actual), se describe según la relación:

$$V_{rec} \frac{dC_{rec}}{dt} = JA - F_{rec}C_{rec} \quad (\text{Ec. 11})$$

donde V_{rec} es el volumen del compartimento receptor, C_{rec} = la concentración de compuesto en el compartimento receptor, J = el flujo de principio activo de la piel al compartimento receptor, A = el área de piel disponible en la difusión y F_{rec} = el flujo del líquido receptor a través de la cámara receptora. El término (dC_{rec}/dt) se refiere a la acumulación del compuesto en la celda del receptor.

Con el objetivo de simplificar el balance de masas, a menudo se ha asumido que la acumulación en la cámara receptora es tan pequeña que se considera despreciable. Esto en principio parecería razonable ya que el flujo de líquido receptor retira el principio activo, limitando físicamente su acumulación. En dicho caso el flujo aparente vendría expresado como (Harrison, *et al.*, 1995):

$$J_{ap1} = \frac{F_{rec} C_{rec}}{A} \quad (\text{Ec. 12})$$

Sin embargo, los resultados obtenidos por diversos autores indicaron que el J_{ap1} , generalmente, no es una buena estimación del flujo intrínseco principalmente en las fases tempranas del experimento de difusión, donde aparentemente la acumulación es mayor. Observaron, en ciertas condiciones experimentales que, aunque se asumiera que el término (dC_{rec}/dt) era pequeño, no era una razón suficiente para eliminarlo de la Ec. 11. Por otra parte, en el caso de principios activos de baja permeabilidad, o volúmenes de receptor muy pequeños combinados con flujos altos de líquido receptor, se conseguía una mejor estimación del flujo intrínseco a partir del J_{ap1} . Dichos autores, estudiaron un segundo flujo aparente (J_{ap2}) al tener en cuenta el término de acumulación en la Ec. 11, quedando la relación como (Harrison, *et al.*, 1995):

$$J_{ap2} = \frac{V_{rec} \frac{dC_{rec}}{dt} + F_{rec} C_{rec}}{A} \quad (\text{Ec. 13})$$

Se comprobó que la aproximación de J_{ap2} era una aproximación correcta del flujo intrínseco en todo el curso del experimento, excepto a tiempo cero (Harrison, *et al.*, 1995).

Diversos autores han estimado el flujo intrínseco a partir de los datos experimentales (C_{rec} frente al tiempo) obtenidos en los ensayos de difusión *in vitro*

mediante el cálculo del flujo aparente a través de la Ec. 12 y Ec. 13 (Harrison, *et al.*, 1995) (Córdoba-Díaz, *et al.*, 2000).

En líneas generales la representación de la cantidad absorbida y acumulada de principio activo en función del tiempo, gráfica (Q - t) (Figura 34) una vez atravesada la membrana, así como, el flujo establecido en función del tiempo, gráfica (J - t) (Figura 34) presenta dos tipos de perfil diferentes según se hayan establecido condiciones de dosis infinitas o dosis finitas (Schaefer, *et al.*, 1996d).

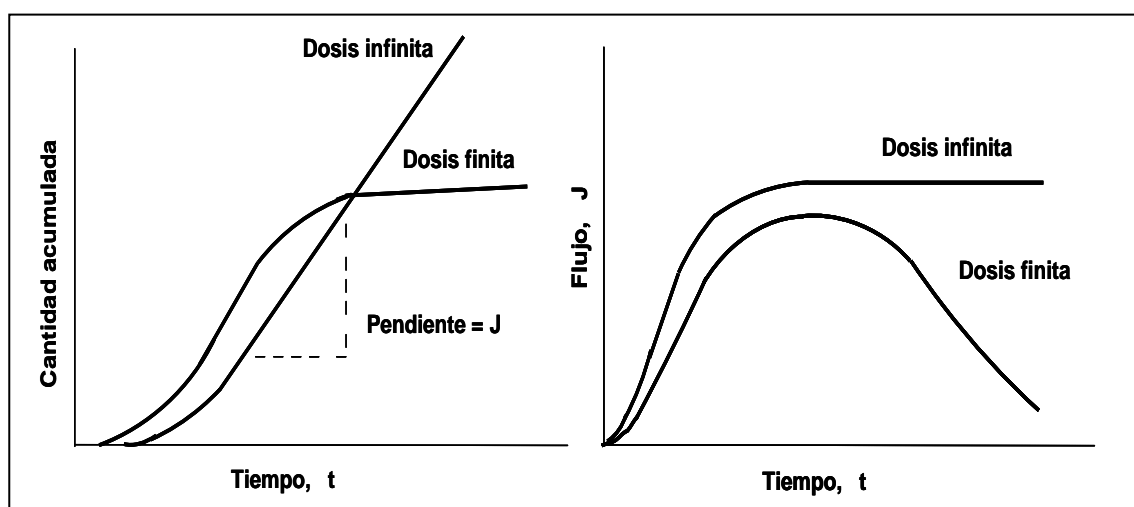


Figura 40. Perfiles de absorción expresados en cantidades acumuladas o en flujos con respecto al tiempo según tengamos un sistema de dosis finita o de dosis infinita (Schaefer, *et al.*, 1996d).

En ensayos de difusión *in vitro* realizados bajo condiciones de dosis infinitas se establece un pseudo estado estacionario representado en la gráfica (Q - t) (Figura 34) a través de una relación lineal, cuya pendiente se corresponde con el máximo flujo. Los valores de flujo cambian con el tiempo, observándose en la gráfica (J - t) (Figura 34), como una vez que aparece el estado estacionario el valor del flujo máximo se mantiene constante. La K_p se calcula aplicando la primera ley de Fick (Ec. 8), a partir del valor de flujo en el estado estacionario (Schaefer, *et al.*, 1996d). La extrapolación de la porción lineal de la curva al eje "x" nos da el tiempo de latencia (Guy, *et al.*, 1989) (Parry, *et al.*, 1990) (Schaefer, *et al.*, 1996d) el cual, es una medida de la difusividad del compuesto

relacionada con su volumen molecular y las propiedades de la barrera de la piel. Se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$D = \frac{h^2}{6L} \quad (\text{Ec. 14})$$

En aquellos experimentos en los que se establecen condiciones de dosis finitas, al contrario de lo que sucede en condiciones de dosis infinitas, la cantidad acumulada en el compartimento receptor es limitada. El estado estacionario normalmente no se establece durante el periodo de exposición aplicado (reflejando las condiciones en uso) o es difícil de determinar (Schaefer, *et al.*, 1996d). Se observa un valor de flujo máximo en la gráfica (J – t) (Figura 34) pero no se mantiene constante. Por todo ello es necesario estudiar cuidadosamente el diseño experimental de un determinado estudio de difusión para que se ajuste a un propósito específico y se obtengan parámetros relevantes (Brain, 1998).

3.3.3.1 Descripción de los estudios llevados a cabo en la presente memoria

Equipo de difusión

Se ha utilizado un equipo automático de difusión PermeGear® ILC- 07 (PermeGear® Riegelsville, PA) (Figura 35), que incluye siete celdas de flujo continuo fabricadas de Kel-F® y colocadas en línea sobre un soporte, el cual, se conecta a un baño termostatzado de circulación Haake®- DC10 (Gebrüde Haake, Karlsruhe, Alemania) que mantiene la temperatura experimental de trabajo. El diseño de las celdas, desmontable, se describe en la Figura 37. Está constituida por los siguientes componentes:

- Un compartimento donador (1) ($\text{Vol} = 1,10 \text{ cm}^3$).
- Un soporte (2) con un orificio de 1cm de diámetro sobre el que se coloca la membrana (área de difusión efectiva $0,785 \text{ cm}^2$).
- Un compartimento receptor (3) ($\text{Vol} = 0,85 \text{ cm}^3$) que presenta conexiones de entrada y salida para el fluido receptor y se cierra por la parte inferior con una tapa de cristal (4), ajustada mediante una contratuerca (5), que permite ver el contenido del interior.
- Todo el sistema se cierra herméticamente mediante una lámina de acero inoxidable (6), adaptada al compartimento donador, que se coloca sobre él encajándose a través de unas tuercas de cierre ajustable.

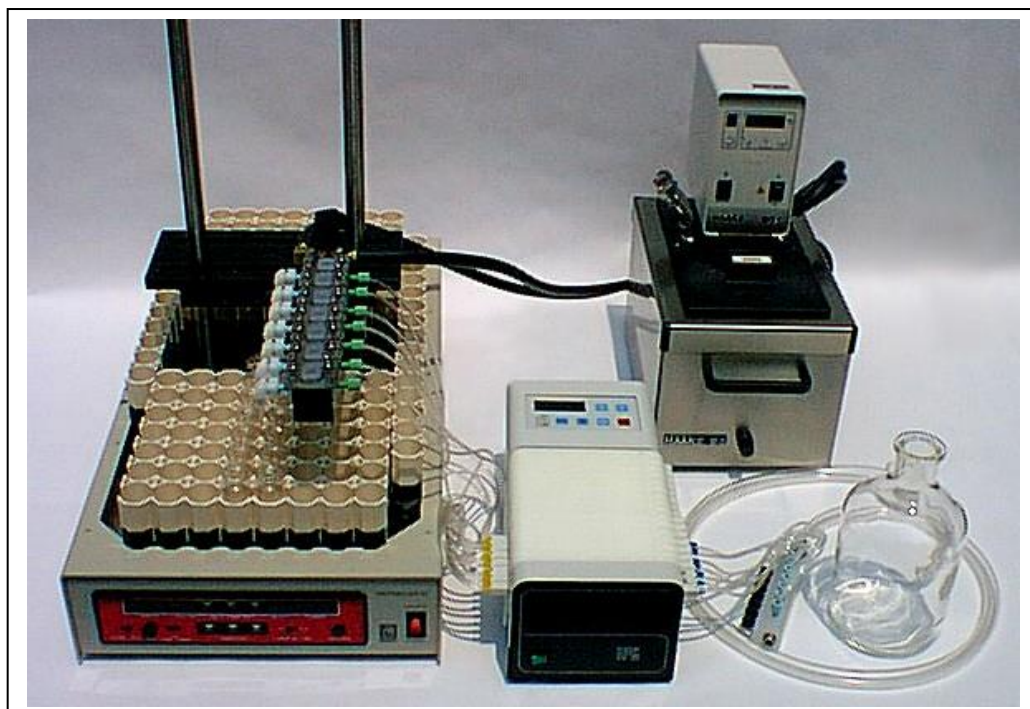


Figura 41. Equipo de difusión de flujo continuo (PermeGear® ILC-07).

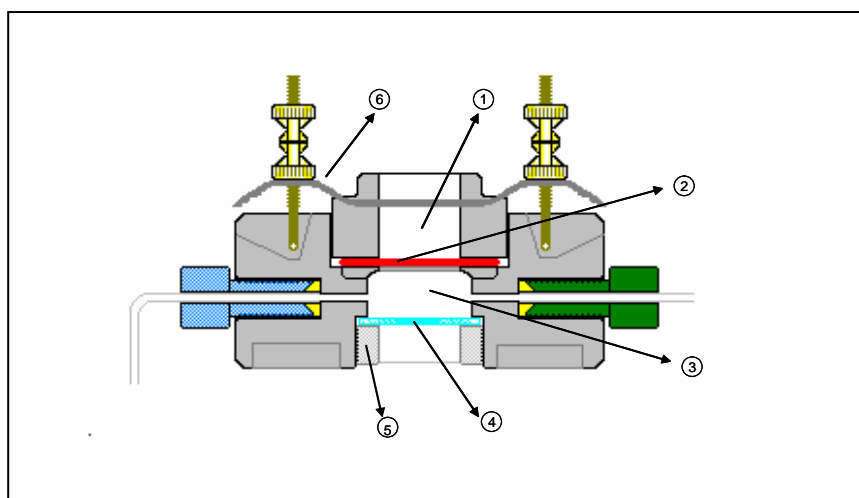


Figura 42. Esquema de la celda de difusión de flujo continuo.

El medio receptor fluye a través del compartimento receptor mediante la incorporación de una bomba peristáltica programable de 16 canales Ismatec® IPC-16 (Ismatec, Zürich, Suiza) utilizando conductos de Tygon™ conectados inicialmente al módulo de distribución, el cual se conecta a su vez a la botella reservorio de vidrio

(Figuras 35 y 37). El fluido sale del compartimento receptor a través de un conducto de Tygon™ hasta los tubos o viales dispuestos en un colector de fracciones Isco® Retriever IV (Isco, Lincoln, NE, USA). En los puntos de unión de los conductos de Tygon™ al módulo de distribución y a las puertas de entrada y salida del compartimento receptor, se aplican conexiones 1/4-28 HPLC. El colector de fracciones se puede manejar de forma manual o mediante un controlador de muestreo programable (disponible por PermeGear®) (Figura 37).

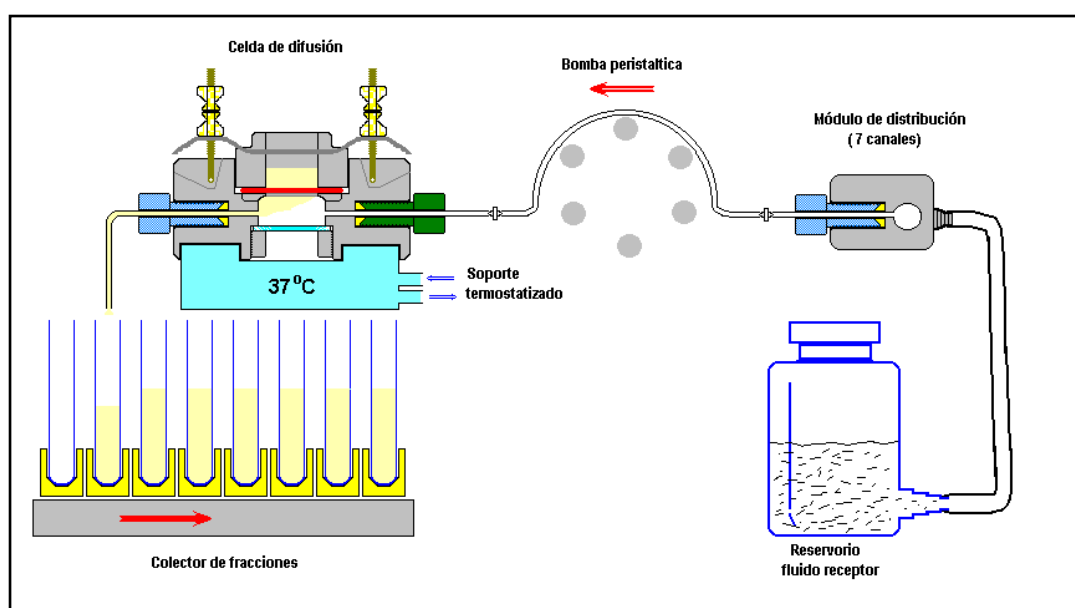


Figura 43. Detalle funcionamiento aparato de difusión de flujo continuo.

Se realizó una validación previa de los elementos mecánicos del equipo de difusión automático de flujo continuo PermeGear® ILC-07 en nuestro laboratorio (Córdoba-Díaz, *et al.*, 2000).

Preparación de membranas utilizadas

En el presente trabajo se han utilizado membranas de origen natural, piel de ratón sin pelo. La piel de ratón sin pelo se obtuvo a partir de la piel dorsal de ratones albinos inmunocompetentes, CLR: SKH1-HrBR (Charles River

3. PARTE TEÓRICA: Caracterización de las formulaciones

Laboratories France), hembras de 4 semanas de edad las cuales estuvieron en el Dpto. de Parasitología, Facultad de Farmacia, UCM durante unos 10-15 días (periodo de aclimatización/adaptación). Los ratones con una edad de 6 semanas, fueron sacrificados por personal especializado, extrayéndoles inmediatamente después mediante disección el trozo de piel dorsal. Antes de utilizar la piel se lavó con agua Milli-Q y se retiró por disección el tejido subcutáneo. Estas muestras fueron conservadas a una temperatura de -20 °C hasta su posterior utilización en el ensayo.



Figura 44. Ratón sin pelo, CLR: SKH1-HrBR.

Se obtuvieron trozos cuadrados de aproximadamente 1 cm de lado se montaron en las celdas de difusión como se observa en Figura 42, orientando en el caso de piel natural siempre el estrato córneo hacia el compartimento donador y la dermis hacia el compartimento receptor.

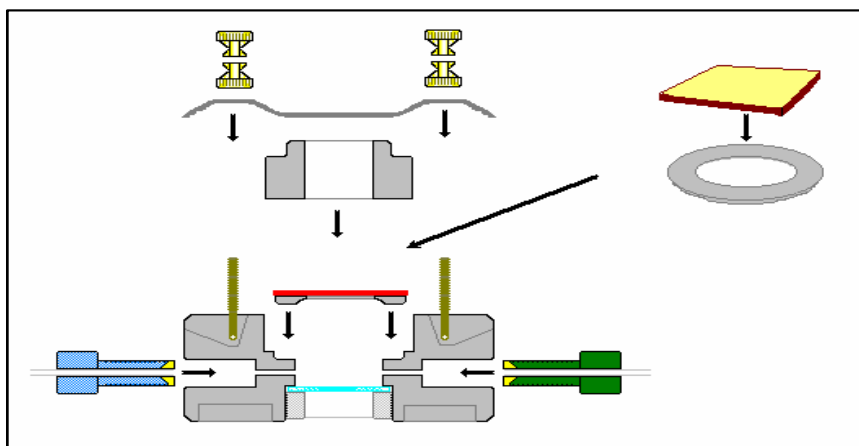


Figura 45. Detalle del montaje de membrana o piel en las celdas de difusión.

Descripción de los estudios de difusión *in vitro* realizados

Una vez montadas las celdas con la membrana de difusión correspondiente, se llenaron los compartimentos receptores con una solución receptora (solución tampón fosfato salino pH=7,4, PBS-Sigma) asegurándose de que no quedaban burbujas de aire debajo de la membrana. Tras un periodo de acondicionamiento de 30 minutos se recogían muestras de medio receptor a modo de blanco. El ensayo de difusión propiamente dicho comenzaba con la disposición de la muestra correspondiente en el compartimento donador y con la puesta en marcha de la bomba y el programador, ajustando así, el flujo de trabajo del medio receptor (F_{rec}) y los intervalos de muestreo.

En los sistemas de difusión de dosis infinita puede calcularse K_p (cm/h) según la primera ley de difusión de Fick (Ec. 8), a partir del valor del flujo del principio activo en el estado estacionario. Sin embargo, los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo se realizaron en condiciones de dosis finitas, en los cuales no llega a alcanzarse de forma clara el estado estacionario. En estos casos se determina el K_p mediante el flujo máximo aparente (J_{max}) equivalente al flujo intrínseco en el estado estacionario. Para ello, el valor de flujo aparente (J_{ap}) para cada intervalo de tiempo, se obtuvo mediante la Ec. 13, calculándose el término de acumulación (dC_{rec}/dt) numéricamente a partir de los

datos de C_{rec} frente al tiempo (Harrison, *et al.*, 1995). Como se observa en la Figura 34, en condiciones de dosis finitas, el flujo experimental aumenta hasta llegar a un máximo y decrece a partir de este valor. Dicho comportamiento permitió ajustar el perfil del flujo obtenido experimentalmente a una función bi-exponencial como la expresada a continuación (Córdoba-Díaz, *et al.*, 2000):

$$J = B(e^{-v_1 t} - e^{-v_2 t}) + C \quad (\text{Ec. 15})$$

donde B es una constante relacionada con la cantidad de principio activo que ha penetrado desde cero a infinito y v_1 y v_2 son las constantes aparentes de velocidad crecientes y decrecientes del flujo. A partir de la primera derivada de la Ec. 15 se obtuvo el valor del tiempo en alcanzar el flujo máximo (t_{jmax}) y flujo máximo aparente (J_{max}). Se aplicó la primera ley de Fick (Ec. 8) lo que dió lugar a la siguiente expresión:

$$Kp = \frac{J_{max}}{C_o} \quad (\text{Ec. 16})$$

donde C_o es la concentración de principio activo de partida en el vehículo.

El ajuste de los modelos cinéticos a los datos experimentales se llevó a cabo por regresión no lineal mediante ajuste estadísticos por mínimos cuadrados ponderados utilizando un programa estadístico adecuado SIMFIT.

En este tipo de estudios se utilizaron dosis finitas y condiciones no oclusivas. Tras finalizar los ensayos, se estudió la acumulación de AmB en piel y difundido a receptor con las distintas formulaciones en estudio. Se compararon los resultados cuantificados de AmB de las distintas pomadas con los obtenidos con una solución control (Solución 2 (AmB-CD (H_2O))), utilizando los mismos parámetros de trabajo, aplicando la misma concentración de principio activo que en las formulaciones tópicas

con el fin de que el parámetro concentración no fuera una variable experimental en estos ensayos.

Con cada formulación se obtuvieron 12 resultados, de pieles procedentes de animales diferentes. Para ello, en cada ensayo se aplicó la formulación evaluada en seis celdas con piel, realizándose con cada formulación el ensayo al menos por duplicado (en días diferentes). Se realizó un estudio comparativo de los resultados obtenidos. En estas experiencias, se ha utilizado el análisis de varianza ANOVA de dos factores (tipo de formulación y ensayo) con varias muestras (celdas) por grupo en la comparación de los datos. De este modo, se tuvo en cuenta la variabilidad inter-animal (en cada celda se utiliza una piel procedente de un animal distinto) e inter-día (se obtuvieron datos de días diferentes).

Procesamiento y análisis de las muestras

La denominación de los distintos tipos de muestra a los que se hace referencia en los diferentes ensayos es la siguiente:

- Muestras remanentes en el compartimento donador: se refieren a los restos de formulación que quedan en el compartimento donador una vez finalizado el ensayo. Se recogieron sobre la superficie de la membrana una vez finalizado el ensayo para su posterior análisis por HPLC. Las muestras se recogieron en solución con DMSO y se llevaron a un eppendorf. Se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min para una posible precipitación de restos biológicos. El sobrenadante se diluyó con la fase móvil correspondiente al método de cuantificación de AmB, en una proporción 1:10 (muestra: fase móvil). Y finalmente, se agitó en vórtex a potencia máxima durante 1 min para su posterior análisis siguiendo el procedimiento descrito en 3.3.1 para la cuantificación de AmB por HPLC.

- Membrana: cualquiera de las barreras, artificiales o naturales, colocadas entre el compartimento donador y receptor, en el presente ensayo las pieles de ratón sin pelo. Una vez desmontadas las celdas, se estiraba la piel sobre una tabla de disección, se secaban los fragmentos de piel con un trozo de papel retirando el exceso de pomada que no se logró retirar en la extracción de las muestras remanes del compartimento donador. Seguidamente, se procedió al cortado del área permeada (círculo central) con un bisturí (Figura 43). Posteriormente, se sometió al tratamiento descrito anteriormente en el punto 3.3.1.

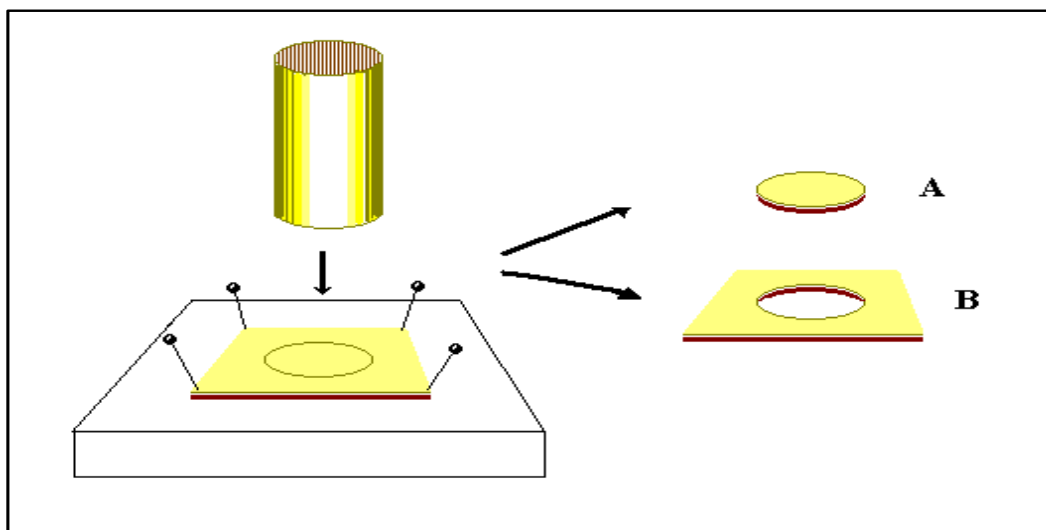


Figura 46. Detalle de la obtención por cortado del disco de piel (A) correspondiente al área de difusión.

- Muestras fluido receptor: atribuido al líquido receptor recogido en los viales del colector de fracciones durante la realización del ensayo en intervalos de tiempo determinados. Este tipo de muestras se agitó en vórtex a potencia máxima durante 1 min para su posterior análisis siguiendo el procedimiento descrito en 3.3.1 para la cuantificación de AmB por HPLC.

3.3.4 Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro*

Se realizaron una serie de estudios *in vitro* en colaboración con el Dpto. de Microbiología II, UCM, con el fin de evaluar la actividad antifúngica de nuestras formulaciones frente a diferentes especies de levaduras. Para ello se utilizaron dos técnicas distintas que se describen detalladamente en este capítulo: *ensayo de difusión en profundidad* y *test de difusión en disco (Kirby-Bauer)* (Cona, 2002) (Mohamed, 2015).

Microorganismos utilizados

Las cepas fúngicas utilizadas en estos estudios fueron amablemente proporcionados por el Dpto. de Microbiología II, UCM, y se enumeran a continuación:

- *Candida albicans* SC5314 (ATCC MYA 2876)
- *Candida guilliermondi* 43L1-BEA+
- *Candida parapsilosis* ATCC 22019
- *Candida glabrata* ATCC 2001
- *Candida krusei* ATCC 6258
- *Saccharomyces cerevisiae* By4741 (MA Ta his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0)

Medios de cultivo

Agar Müeller-Hinton (MHA) (Conda-Pronadisa)

- Infusión de carne..... 300 g
- Peptona de caseína 17,5 g
- Almidón 1,5 g
- Agar simple 17,0 g
- Agua destilada, c.s.p. 1000 ml

Se disolvieron todos los componentes en el agua, a excepción del agar, y se ajustó a pH 7,3. Se añadió el agar y se calentó hasta ebullición para que se disolviera

por completo. Una vez disueltos todos los componentes, se suplementó con un 2 % (p/v) de glucosa. Se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos y una vez atemperado a 50 °C, se añadieron 0,5 µg/ml azul de metileno. Por último, se dispensó en placas Petri estériles a razón de unos 20 ml por placa, con el fin de obtener un espesor de 4 mm.

Agar YPD (Difco)

Este medio fue proporcionado por el Dpto. de Microbiología II.

Fórmula para un litro:

- Extracto de levadura 10,0 g
- Peptona 20,0 g
- Glucosa 20,0 g
- Agar 15,0 g

Condiciones de mantenimiento, cultivo y siembra

- Mantenimiento de los microorganismos. El mantenimiento de 1 microorganismo se llevó a cabo mediante resiembras periódicas en tubo inclinado de agar-YPD. Las resiembras se mantuvieron 2-3 días a 28 °C y se conservaron posteriormente a 4 °C.
- Condiciones del cultivo y preparación de inóculos. Los cultivos en medio líquido se desarrollaron, rutinariamente, en matraces Erlenmeyer conteniendo un tercio de su capacidad total de medio de cultivo (YPD). El inóculo se realizó con células crecidas previamente en el mismo medio (pre-inóculo). Los cultivos se incubaron a 30-37 °C, en un agitador orbital a 250 rpm, durante 14-18 h.

Los pre-inóculos se prepararon bien a partir de un cultivo stock (mantenidos a -80 °C); o bien a partir de cultivos líquidos, inoculados con una colonia del microorganismo procedente de una placa (cultivo joven de 48 h) e incubados a 30-37 °C, 14-18 h. El crecimiento se determinó midiendo la turbidez del cultivo por absorbancia a 600 nm, en un espectrofotómetro. Para ello, las muestras de los microorganismos se diluyeron (en agua destilada estéril) de forma que su absorbancia

(densidad óptica, D.O.) estuviese comprendida entre 0,1 y 0,4, rango en el que la relación entre la absorbancia y el número de células es lineal.

Los inóculos (10^5 - 10^7 UFC/ml) se ajustaron para cada microorganismo en función de la siguiente relación: 1 unidad de absorbancia (600 nm) corresponde a $2,5 \times 10^7$ UFC/ml para *Candida* spp.; 1 unidad de absorbancia (600 nm) corresponde a 1×10^7 UFC/ml para *S. cerevisiae*.

- Siembra por dilución en masa (inclusión en agar). Esta técnica consiste en inocular el medio de cultivo, previamente fundido y atemperado (aproximadamente a 45 °C), con la muestra (inóculo 10^5 UFC/ml). Una vez homogeneizada la mezcla por rotación suave, se vierte directamente en placas Petri vacías, en condiciones de esterilidad.
- Siembra por extensión en superficie. Esta técnica consiste en impregnar una torunda con la suspensión del inóculo, 10^7 UFC/ml, equivalente al patrón de turbidez $n=0,5$ de McFarland (0,5 ml de cloruro de bario 0,048 M y 99,5 ml de ácido sulfúrico 0,36 M); escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie de la placa, mediante estrías cruzadas en varias direcciones. Antes de 15 minutos deben colocarse los discos de antibióticos.

Ensayo de difusión en profundidad

Para el *ensayo de difusión en profundidad* de la actividad antifúngica, se prepararon placas de medio sólido Mueller-Hinton (MHA) sembradas mediante la técnica de dilución en masa o inclusión en agar (descrito previamente), para las distintas cepas de hongos. Una vez solidificadas, se hicieron pocillos de aproximadamente 4 mm de profundidad, con pipetas Pasteur de vidrio estériles cuyo diámetro externo es de 7 mm. El volumen final de los pocillos fue de 0,15 ml. Las formulaciones ensayadas fueron:

- Pomada Base
- Pomada Ciclodextrinas
- Orabase

Las formulaciones (incluidos los controles) se introdujeron en jeringas estériles de 1 ml. En los pocillos se depositaron 0,1 ml (equivalentes a unos 0,1 g) de cada formulación. Las placas ya preparadas se mantuvieron a 4 °C, 2 h. Posteriormente, se incubaron invertidas a 37 °C (para las especies de *Candida*) y a 30 °C (para *Saccharomyces cerevisiae*), durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se midieron los diámetros (mm) de los halos de inhibición producidos por las distintas formulaciones. Este ensayo fue repetido cinco veces en días alternos.

Test de difusión en disco (Kirby-Bauer)

Para el *test de difusión en disco* de la actividad antifúngica, se prepararon placas de medio sólido Mueller-Hinton (MHA) sembradas mediante la técnica de extensión en superficie (descrito previamente), para las distintas cepas de hongos.

Se utilizaron discos antibióticos de 6 y 12 mm de diámetro.

Discos 6 mm (impregnados con 20 µl de las siguientes formulaciones):

- Suspensión 1: AmB (H₂O); con una carga final de 25 µg AmB.
- Solución 2: AmB-CD (H₂O); con una carga final de 25 µg AmB.
- Solución 3: AmB (DMSO); con una carga final de 25 µg AmB.
- Solución 4: AmB_c (DMSO); con una carga final de 125 µg AmB.
- DMSO
- CD ((H₂O)

Discos 12 mm (impregnados con 100 µl de la siguiente formulación):

- Solución 3: AmB (DMSO); con una carga final de 125 µg AmB.

Se dejaron secar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Con pinzas flameadas y frías (o con un aplicador automático) se colocaron los discos sobre las

placas, de forma que distasen unos 15 mm del borde de la placa y unos 30 mm entre sí. Se adhirieron al agar presionando ligeramente con las pinzas.

Las placas ya preparadas se mantuvieron a 4 °C, 2 h. Posteriormente, se incubaron invertidas a 37 °C (para *Candida* spp.) y a 30 °C (para *S. cerevisiae*), durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se midieron los diámetros (mm) de los halos de inhibición producidos por las distintas formulaciones.

Estos ensayos, para la suspensión 1 y 2, fueron repetidos tres veces en días alternos y para la solución 3 y 4 dos veces también en días alternos.

3.4 Análisis estadístico de los resultados

Aspectos generales del análisis estadístico

Cuando poseemos una serie de resultados obtenidos experimentalmente, el principal problema que se nos plantea radica en dilucidar en qué medida dichos valores son capaces de representar una conclusión atribuible al conjunto de la población de donde proceden. A través de la utilización del método estadístico de error, podemos obtener conclusiones sobre una determinada población a partir de una muestra limitada, en virtud de una elegante abstracción matemática.

Existen muchos posibles tipos de cuadros de variación o distribución de frecuencia que pueden definir la variación de una serie de medidas de varias muestras. No obstante, la distribución más común se corresponde con una curva de Gauss a una repetición infinita (Knudsen, *et al.*, 2003). En ella podemos determinar tanto su valor central (m) como el error tipo o desviación estándar de la media (S_m). En este sentido, una distribución normal se caracteriza por que entre la media y su error tipo a cada lado de la curva de Gauss, se encuentra el 68,27 % del área de la curva (Vizmanos, *et al.*, 1976). Dicho de otro modo, el 68,27 % de las observaciones que se realicen se encontrarán en el intervalo $[m \pm S]$. De la misma forma, el 95 % de las observaciones están comprendidas en el intervalo $[m \pm 1,96 S]$, y el 99 % en el $[m \pm 2,58 S]$, como podemos observar en la Figura 44:

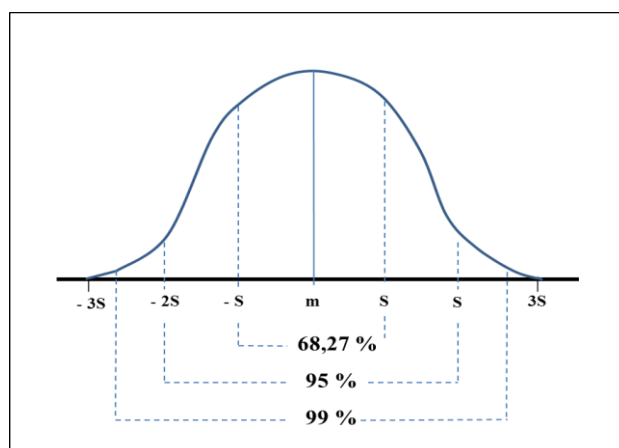


Figura 47. Distribución normal de frecuencia.

El margen de confianza de la población inaccesible se denomina intervalo de confianza y la probabilidad de que dicha población escape de él, probabilidad de error (p). Los intervalos de confianza utilizados más habitualmente son el del 5 % ($p < 0,05$) y el del 1 % ($p < 0,01$).

Estimación de una población a partir de una muestra

La manera más intuitiva de establecer un intervalo de confianza que englobe la población inaccesible a partir de un número (n) limitado de valores (x_i) correspondiente a una muestra, consiste en la utilización del promedio o media aritmética (m) y la desviación estándar (S). Para la obtención de dichos parámetros utilizaríamos las siguientes expresiones:

$$m = \frac{\sum x_i}{n} \quad S = S_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n - 1}} \quad (\text{Ec. 17})$$

Como puede observarse, S es la desviación estándar poblacional, estimada a partir de la muestra mediante la expresión anterior, deducida de la corrección de Bessel.

Para la definición del intervalo de confianza, más correcto que usar S sería usar S_m o desviación estándar de la media. Se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n - 1}} \quad (\text{Ec. 18})$$

El intervalo quedaría pues definido de la forma siguiente:

$$\boxed{[m \pm S_m]} \quad (\text{Ec. 19})$$

No obstante en la experiencia no siempre contamos con muestras grandes, por lo que la curva de Gauss se achataría, tanto más cuanto más disminuya el tamaño de la

muestra a partir de 30. Así, para tamaños muestrales inferiores a 30 necesitamos un coeficiente corrector progresivo para S_m denominado t de Student, que da lugar a la distribución del mismo nombre y que está convenientemente tabulada (Córdoba, *et al.*, 1990). Así pues, para muestras inferiores de 30, con una media m y $n-1$ grados de libertad, para un cierto nivel de seguridad el intervalo de confianza se define de la siguiente forma:

$$[m \pm t \cdot S_m] \quad (\text{Ec. 20})$$

Comparación de dos muestras

Cuando se desea realizar un estudio comparativo entre dos muestras A y B obtenidas experimentalmente, resulta interesante comprobar si la diferencia hallada en los resultados de cada una puede ser atribuida al azar o si, por el contrario, es excesiva para que el azar la explique, en cuyo caso diremos que existe entre las dos muestras una diferencia estadísticamente significativa para un grado de seguridad determinado (utilizaremos por lo general probabilidades del 95 % ($p = 0,05$)). Una manera de realizar este estudio consiste en comprobar la homogeneidad de los valores medios de cada muestra, es decir, si la diferencia entre sus muestras ($m_A - m_B$) es superior a la que estrictamente podría ser atribuible al azar.

Dado que en nuestro estudio trabajaremos con muestra de tamaño inferior a 30, utilizaremos un test t de Student. Así, comparamos el valor de t tabulado para ($n_A + n_B - 2$) grados de libertad y una $p = 0,05$, con el obtenido experimentalmente a partir de la siguiente expresión:

$$t_{exp} = \frac{|m_A - m_B|}{\sqrt{\frac{S^2}{n_A} + \frac{S^2}{n_B}}} \quad (\text{Ec. 21})$$

Siendo S^2 la varianza combinada de las dos muestras, que se calcula a partir de la fórmula siguiente:

$$S^2 = \frac{(n_A - 1) \cdot S^2 + (n_B - 1) \cdot S_B^2}{(n_A - 1) + (n_B - 1)} \quad (\text{Ec. 22})$$

Una vez obtenidos los valores de t experimental y t tabulado, los casos posibles son los siguientes:

$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}} \square$ No existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores medios de las dos muestras, para una probabilidad del 95 %.

$t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}} \square$ Existe diferencia significativa.

Otro aspecto de gran importancia a la hora de comparar dos muestras radica en la comprobación de que sus varianzas son homogéneas. Para verificar esta hipótesis se recurre a la prueba F de Fischer-Snedecor. Para ello, calculamos la varianza correspondiente a cada una de las dos muestras y dividimos la mayor entre la menor. Este cociente se denomina F experimental (F_{exp}):

$$F_{\text{exp}} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (\text{Ec. 23})$$

La tabla de Snedecor (F tabulado) presenta las máximas desproporciones que el azar permite con n-1 grados de libertad.

En el presente estudio, se realizará la comparación de muestras provenientes de los distintos experimentos usando pruebas de t y de F, y análisis de varianza para detectar diferencias estadísticamente significativas con Microsoft Excel 2013. Para los ajustes cinéticos lineales y no lineales se utiliza el paquete estadístico SIMFIT (SIMFIT package University of Manchester, WG Bardsley).

4. PARTE EXPERIMENTAL: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Pomada Base (AmB)

Tras la elaboración descrita en el apartado 3.2.4 se obtuvo una pomada de color amarillento, sin olor, con textura granulosa debido a la textura del propio Orabase®.

Esta formulación tras un periodo de tiempo de un año a temperatura ambiente, sigue conservando aparentemente las mismas características anteriormente descritas: color, olor y textura, sin apreciarse fenómenos de separación de fases ni desestructuración de la formulación.



Figura 48. Pomada Base.

4.1.1 Caracterización reológica

Extensibilidad

Resultados del análisis de extensibilidad de la Pomada Base (AmB).

4. PARTE EXPERIMENTAL: Pomada Base (AmB)

Peso (g)	Superficie (mm ²) ensayo 1	Superficie (mm ²) ensayo 2	Superficie (mm ²) ensayo 3	S media \pm SD (mm ²)
28	490,87	490,87	415,48	465,74 \pm 43,53
78	615,75	615,75	593,96	608,49 \pm 12,58
128	730,62	779,31	730,62	746,85 \pm 28,11
178	881,41	881,41	907,92	890,25 \pm 15,30
228	989,80	989,80	989,80	989,8 \pm 0,00
278	1046,35	1075,21	1046,35	1055,97 \pm 16,66
328	1164,16	1194,59	1134,11	1164,29 \pm 30,24

Tabla 18. Datos experimentales de extensibilidad Pomada Base (AmB).

Informe del análisis de regresión de los datos extensiométricos y valor calculado del índice de extensibilidad (Ie), utilizando SIMFIT:

Results for Unweighted fitting (all s = 1)

Parameter	Value	Std. error	... 95% con. lim...	p
Intercept	4.348E+02	1.61E+01	4.01E+02 4.69E+02	0.000
Slope	2.310E+00	7.90E-02	2.14E+00 2.47E+00	0.000

(R-squared = 0.9783, R = 0.9891, p = 0.0000)

Analysis of Residuals

```

Analysis of residuals:    SSQ = 2.488E+04
Est. average % coeff.var. = 4.278
R-squared, cc(theory,data)^2 = 0.978
Largest Abs.rel.res. = 18.36 %
Smallest Abs.rel.res. = 0.03 %
Average Abs.rel.res. = 3.32 %
Abs.rel.res. in range 10-20 % = 4.76 %
Abs.rel.res. in range 20-40 % = 0.00 %
Abs.rel.res. in range 40-80 % = 0.00 %
Abs.rel.res. > 80 % = 0.00 %
No. res. < 0 (m) = 9
No. res. > 0 (n) = 12
No. runs observed (r) = 7
P(runs =< r : given m and n) = 0.040      Reject at 5% sig. level
5% lower tail point = 7
1% lower tail point = 5
P(runs =< r : given m plus n) = 0.058
P(signs =< least no. observed) = 0.664
Durbin-Watson test statistic = 1.260 <1.5, +ve serial correlation?
Shapiro-Wilks W (wtd. res.) = 0.963
Significance level of W = 0.573
Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 2.166E+02 ( 2.156E+02)

```

x-input	y-calculated	95% confidence limits
2.000E+02	8.967E+02	8.798E+02 9.136E+02

El extensograma obtenido a partir de los datos extensiométricos medios, se recoge en la siguiente figura.

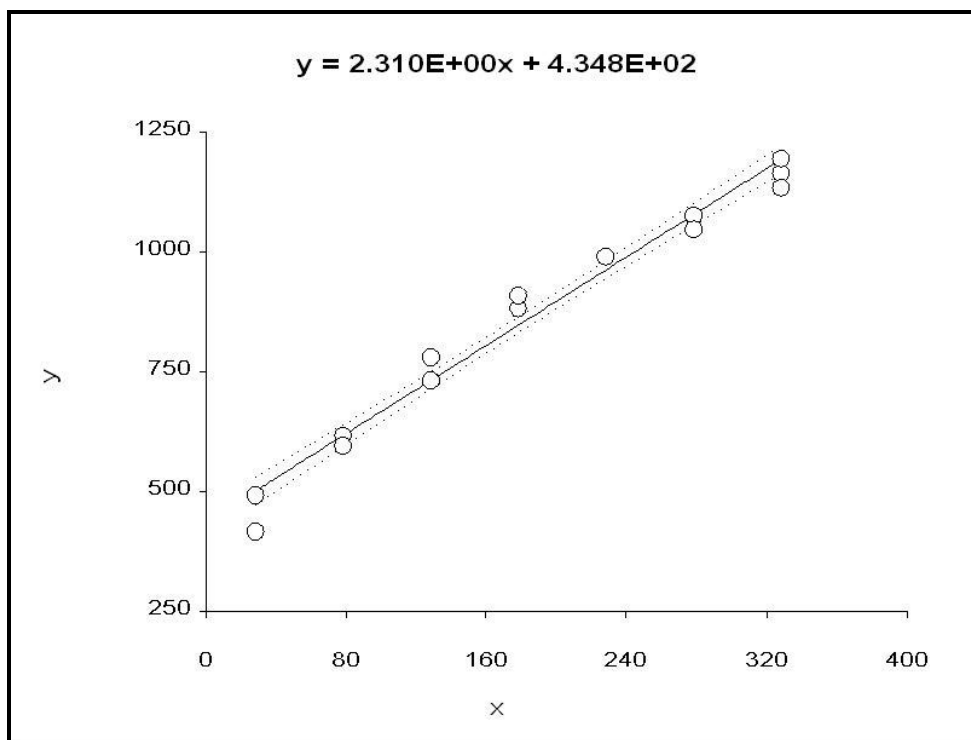


Figura 49. Extensograma Pomada Base (AmB): datos medios \pm I.C. (95 %).

Según los datos obtenidos mediante el análisis de regresión (SIMFIT), el índice de extensibilidad (I_e) calculado es de $896,7 \pm 16,9 \text{ mm}^2$ (I.C. 95 %).

Viscosidad

Resultados del análisis de viscosimetría de la Pomada Base (AmB).

Velocidad (RPM)	Torsión (%)	Viscosidad (Pa.s)	Fuerza de cizalla (D/cm ²)	Velocidad de cizalla (1/s)
0,00	-5,81	0,00	0,00	0,00
2,50	8,09	28,47	1423,38	5,00
5,00	21,60	33,97	3397,25	10,00
7,50	23,99	25,11	3766,86	15,00
10,00	25,39	19,97	3994,91	20,00
12,50	26,41	16,55	4136,46	25,00
15,00	26,39	13,95	4183,65	30,00
12,50	24,45	15,35	3845,50	25,00
10,00	23,96	18,87	3774,72	20,00
7,50	23,04	24,17	3625,30	15,00
5,00	19,78	31,14	3114,14	10,00
2,50	18,03	56,78	2838,90	5,00
0,00	8,04	0,00	0,00	0,00

Tabla 19. Datos experimentales de viscosidad Pomada Base (AmB).

Representación gráfica de la fuerza de cizalla frente a la velocidad de cizalla:

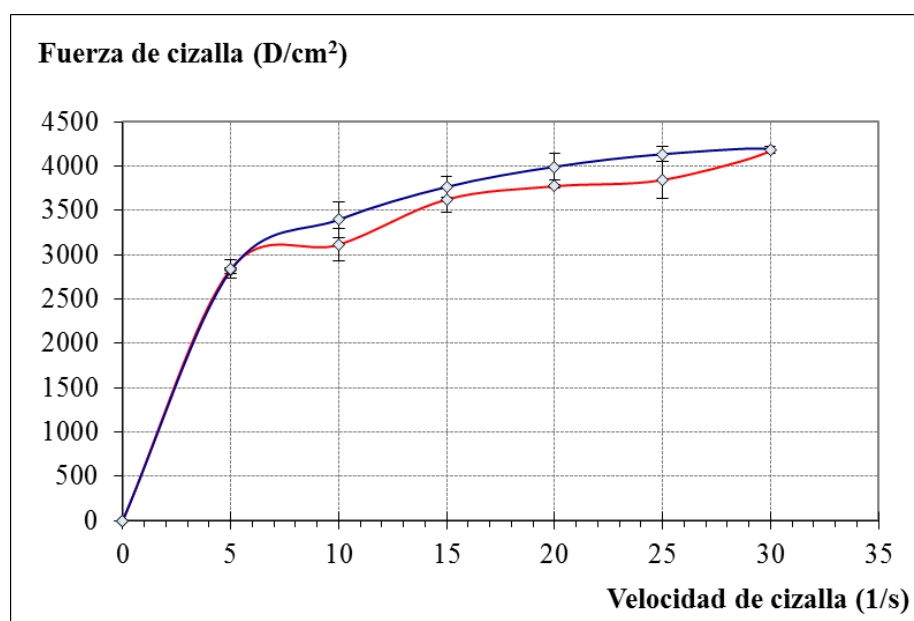


Figura 50. Reograma Pomada Base (AmB).

Según los datos de la Tabla 19 se calculó el área bajo la curva tanto de la rampa de subida como de la rampa de bajada para obtener finalmente la tixotropía. En este

caso, la tixotropía media fue de $28,33 \pm 12,26$ Pa (I.C. 95 %). Se realizó un ajuste por regresión lineal bi-logarítmica con los datos experimentales de la misma tabla y se obtuvo la consistencia media, $m = 1988,79 \pm 92,54$ (I.C. 95 %) y un índice de comportamiento de flujo por debajo de 1 ($n < 1$).

Observaciones

A partir del reograma y de los datos obtenidos, se observa un comportamiento pseudoplástico con un escaso grado de tixotropía. Presenta unos valores de extensibilidad, consistencia y viscosidad que posteriormente se analizarán en el capítulo 4. 4 Análisis comparativo de los datos.

4.1.2 Estudios de difusión *ex-vivo*

Se realizaron estudios de difusión utilizando como membrana la piel de ratón sin pelo (SKH1-HrBR), la cual constituye un modelo de piel adecuado como alternativa al uso de piel humana.

Variables experimentales comunes

Celda tipo: Flujo Continuo PermeGear ILC-07
Membrana de difusión: piel dorsal ratón sin pelo
Temperatura: 37° C
Concentración de principio activo en formulación donadora (C_{don_0}): 1250 µg/ml
Cantidad teórica aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,1 ml
Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 125 µg
Solución receptora: Tampón PBS pH=7,4
Flujo de líquido receptor (Frec): 1,5 ml/24 h
Duración del ensayo: 24 h
Número de celdas por ensayo (n): 6
Número de ensayos por formulación: 2 ($n_{totales}$ = 12 celdas)

A continuación, en la siguiente Tabla 20 se muestran las cantidades de principio activo calculadas a partir de las señales obtenidas en el análisis de las muestras de la membrana, piel de ratón sin pelo (HPLC):

Celda	mg de la fórmula aplicada	µg AmB Q ₀	µg AmB en PIEL Q _{acum}	% AmB en PIEL Q _{acum}
I	100,96	126,20	0,31	0,25
II	100,89	126,11	0,24	0,19
III	101,72	127,15	0,42	0,33
IV	101,17	126,46	0,25	0,20
V	506,00	632,50	0,51	0,08
VI	289,00	361,25	0,29	0,08
VII	504,00	630,00	0,50	0,08
VIII	171,00	213,75	0,17	0,08
IX	167,00	208,75	0,17	0,08
		Media	0,32	0,15
		SD	0,12	0,09
		IC95	0,08	0,06

Tabla 20. Cantidades acumuladas de AmB en la membrana tras 24 horas.

Observaciones

El porcentaje medio de principio activo acumulado en las pieles tras 24 horas de exposición a la formulación en relación a las cantidades inicialmente dispuestas es de $0,15 \pm 0,06$ (I.C. 95 %). En el compartimento receptor se obtuvieron valores de AmB por debajo del límite de cuantificación (< LC).

4.1.3 Actividad antifúngica *in vitro*

En este ensayo de difusión en profundidad, los halos de inhibición obtenidos fueron muy claros y fácilmente medibles, como se observa en la siguiente Figura 51.

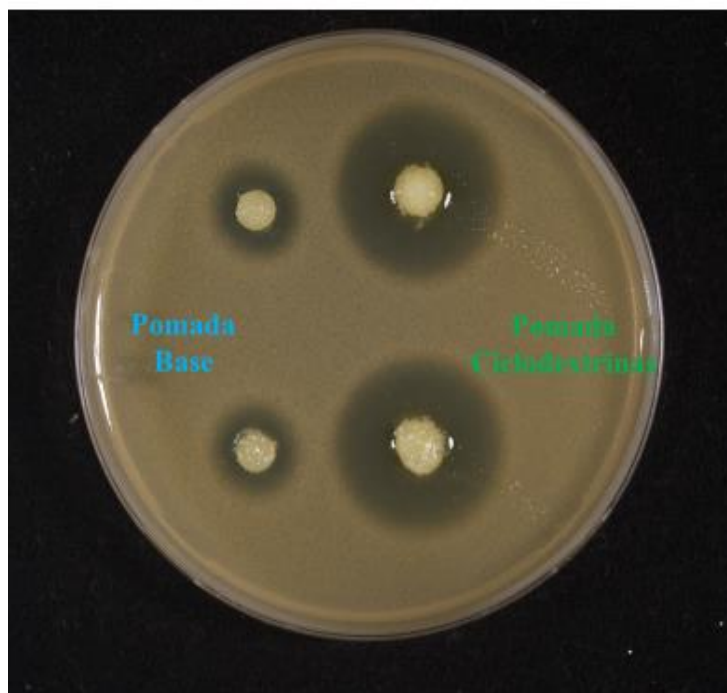


Figura 51. Actividad antifúngica de la Pomada Base (AmB) y la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) frente a *Candida glabrata* ATCC 2001, en agar Müller Hinton, por ensayo de difusión en profundidad.

En la Tabla 21 se presenta el promedio de las medidas de los halos de inhibición obtenidos con cada cepa estudiada con su desviación estándar correspondiente.

MICROORGANISMO	Halo de inhibición (mm)
	Pomada Base (AmB)
<i>Candida albicans</i> SC5314	13 ± 1,87
<i>Candida guilliermondi</i> 43LI-BEA+	12,20 ± 1,92
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	14,40 ± 0,55
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	13,40 ± 1,67
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	7,40 ± 0,55
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> By	10 ± 1,83

Tabla 21. Halos de inhibición (mm) y desviación estándar de la medida de los halos, obtenidos en el ensayo de difusión en profundidad de la actividad antifúngica de la Pomada Base (AmB) sobre las distintas cepas.

Los resultados para este ensayo se observan claramente en una gráfica de barras. Las líneas horizontales de color rojo corresponden a los límites que permiten considerar si una cepa es sensible, tiene sensibilidad intermedia o es resistente frente al fármaco en estudio.

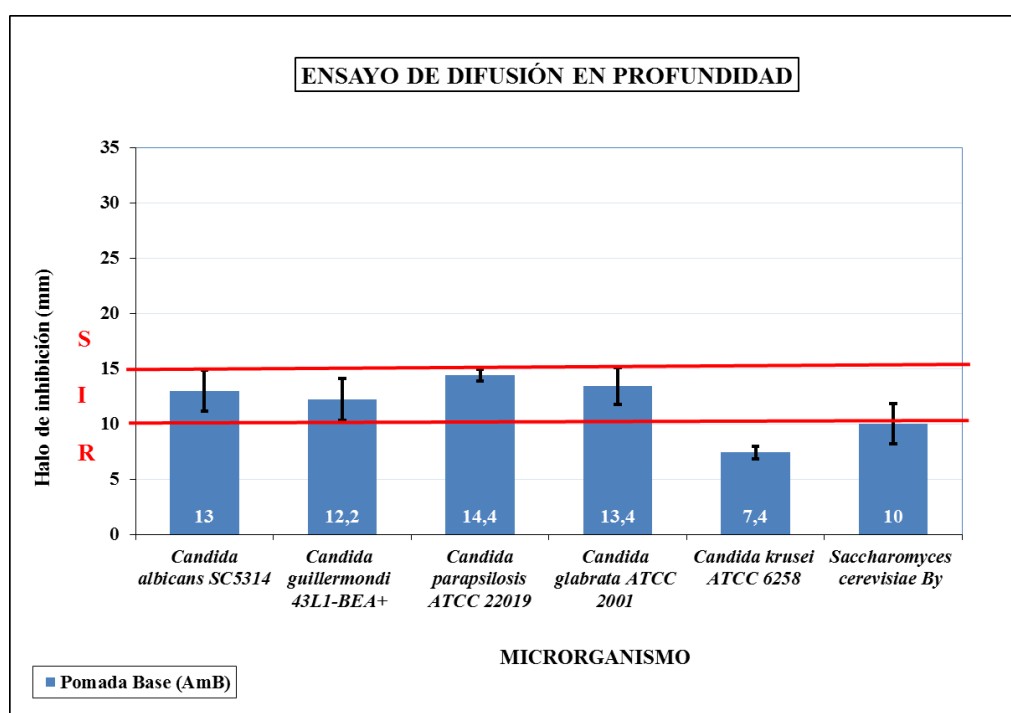


Figura 52. Promedio de las medidas de los halos de inhibición obtenidos con la Pomada Base (AmB) y su desviación estándar correspondiente. Las líneas horizontales rojas determinan la sensibilidad: Resistente (R), si el halo de inhibición es menor de 10 mm. Intermedio (I), si la medida está entre 10 y 14 mm. Sensible (S), si la medida es mayor o igual de 15 mm (Espinell-Ingroff, *et al.*, 2008).

Observaciones

A partir de los datos obtenidos, se observa que la formulación presenta una acción antifúngica intermedia frente a las distintas cepas estudiadas, excepto para *C. krusei* ATCC 6258 que es resistente. Tampoco se aprecian diferencias interespecíficas.

4.2 Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD)

Tras la elaboración descrita en el apartado 3.2.4 se obtuvo una pomada de color amarillo más intenso con respecto a la anterior formulación, sin olor, con textura granulosa debido a la textura del propio Orabase®.

Esta formulación tras un periodo de tiempo de un año a temperatura ambiente, sigue conservando aparentemente las mismas características anteriormente descritas: color, olor y textura, sin apreciarse fenómenos de separación de fases ni desestructuración de la formulación.



Figura 53. Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD).

4.2.1 Caracterización reológica

Extensibilidad

Resultados del análisis de extensibilidad de la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD).

Peso (g)	Superficie (mm ²) ensayo 1	Superficie (mm ²) ensayo 2	Superficie (mm ²) ensayo 3	S media ± SD (mm ²)
----------	---	---	---	------------------------------------

4. PARTE EXPERIMENTAL: Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD)

28	346,36	346,36	346,36	346,36 ± 0,00
78	551,55	572,56	530,93	551,68 ± 20,81
128	706,86	683,49	706,86	699,13 ± 13,49
178	829,58	804,25	829,58	821,13 ± 14,62
228	907,92	881,41	907,92	899,08 ± 15,30
278	1017,88	989,80	962,11	989,93 ± 27,88
328	1075,21	1075,21	1046,35	1065,59 ± 16,66

Tabla 22. Datos experimentales de extensibilidad Pomada Ciclodextrinas (AmB CD).

Informe del análisis de regresión de los datos extensiométricos y valor calculado del índice de extensibilidad (Ie), utilizando SIMFIT:

Results for Unweighted fitting (all s = 1)

Parameter	Value	Std. error	... 95% con. lim...	p
Intercept	3.563E+02	2.17E+01	3.11E+02 4.02E+02	0.000
Slope	2.310E+00	1.06E-01	2.09E+00 2.53E+00	0.000

(R-squared = 0.9614, R = 0.9805, p = 0.0000)

Analysis of Residuals

```

Analysis of residuals:      SSQ = 4.496E+04
Est. average % coeff.var.  =      6.337
R-squared, cc(theory,data)^2 = 0.961
Largest Abs.rel.res.      =    19.46 %
Smallest Abs.rel.res.     =     0.19 %
Average Abs.rel.res.      =     6.45 %
Abs.rel.res. in range 10-20 % =    14.29 %
Abs.rel.res. in range 20-40 % =     0.00 %
Abs.rel.res. in range 40-80 % =     0.00 %
Abs.rel.res. > 80 %      =     0.00 %
No. res. < 0 (m)          =     10
No. res. > 0 (n)          =     11
No. runs observed (r)     =      7
P(runs =< r : given m and n) = 0.035      Reject at 5% sig. level
5% lower tail point      =      7
1% lower tail point      =      5
P(runs =< r : given m plus n) = 0.058
P(signs =< least no. observed) = 1.000
Durbin-Watson test statistic = 0.479 <1.5, +ve serial correlation?
Shapiro-Wilks W (wtd. res.) = 0.908
Significance level of W    = 0.049      Reject normality
Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 2.290E+02 ( 2.280E+02)

```

x-input	y-calculated	95% confidence limits	
2.000E+02	8.184E+02	7.956E+02	8.411E+02

El extensograma obtenido a partir de los datos extensiométricos medios, se recoge en la siguiente figura.

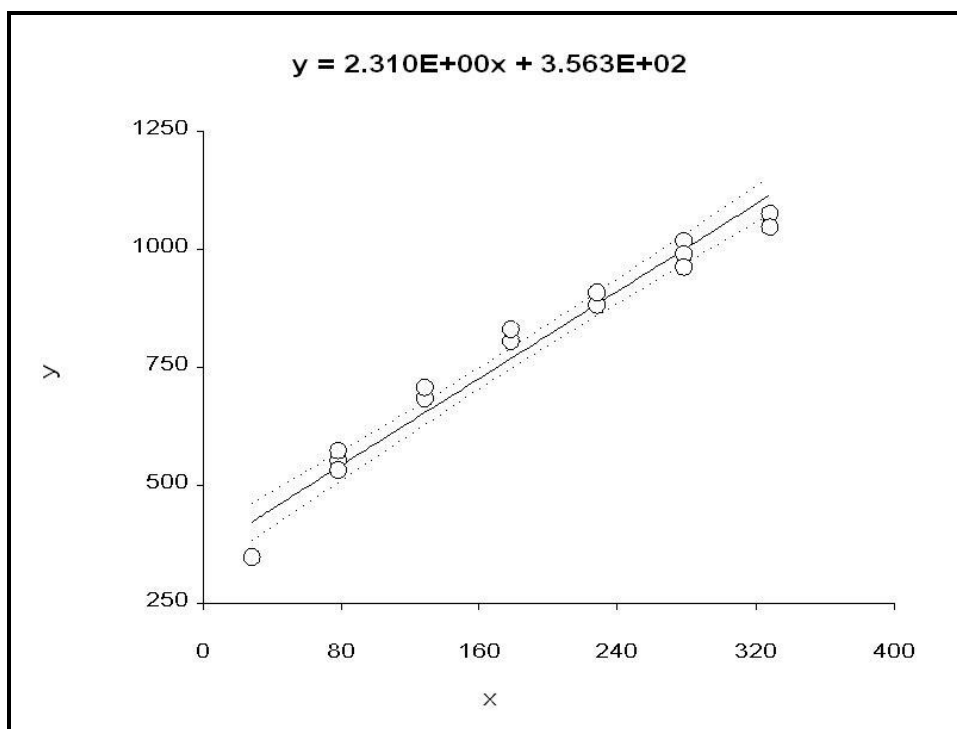


Figura 54. Extensograma Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD): datos medios \pm I.C. (95 %).

Según los datos obtenidos mediante el análisis de regresión (SIMFIT), el índice de extensibilidad (I_e) calculado es de $818,4 \pm 22,75 \text{ mm}^2$ (I.C. 95 %).

Viscosidad

Resultados del análisis de viscosimetría de la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD).

Velocidad (RPM)	Torsión (%)	Viscosidad (Pa.s)	Fuerza de cizalla (D/cm ²)	Velocidad de cizalla (1/s)
0,00	-6,50	0,00	0,00	0,00
2,50	16,55	52,11	2605,61	5,00
5,00	27,74	43,62	4361,90	10,00
7,50	29,10	30,48	4582,09	15,00
10,00	30,51	24,01	4802,28	20,00
12,50	30,90	19,46	4865,19	25,00
15,00	33,01	17,41	5221,70	30,00
12,50	30,45	19,17	4791,80	25,00
10,00	29,49	23,57	4707,91	20,00
7,50	27,19	28,28	4241,32	15,00
5,00	24,85	39,06	3905,79	10,00
2,50	22,69	70,99	3565,01	5,00
0,00	11,18	0,00	0,00	0,00

Tabla 23. Datos experimentales de viscosidad Pomada Ciclodextrinas (AmB CD).

Representación gráfica de la fuerza de cizalla frente a la velocidad de cizalla:

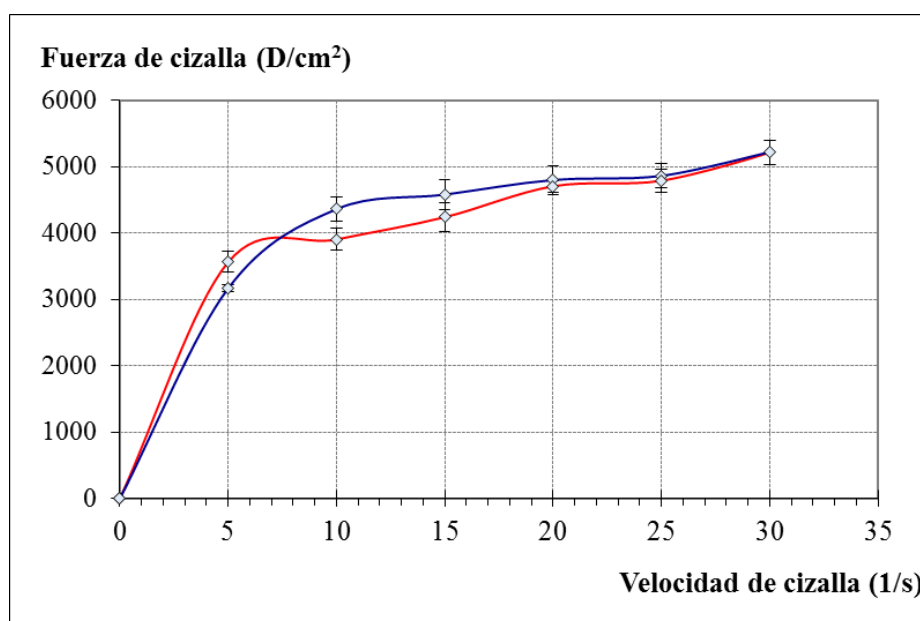


Figura 55. Reograma Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD).

Según los datos de la Tabla 23 se calculó el área bajo la curva tanto de la rampa de subida como de la rampa de bajada para obtener finalmente la tixotropía. En este

caso, la tixotropía media fue de $29,58 \pm 0,79$ Pa (I.C. 95 %). Se realizó un ajuste por regresión lineal bi-logarítmica con los datos experimentales de la misma tabla y se obtuvo la consistencia media, $m = 2534,03 \pm 327,21$ (I.C. 95 %) y un índice de comportamiento de flujo por debajo de 1 ($n < 1$).

Observaciones

A partir del reograma y de los datos obtenidos, se observa un comportamiento pseudoplástico con un escaso grado de tixotropía. Presenta unos valores de extensibilidad menores que las otras formulaciones por lo que su consistencia y viscosidad son mayores.

4.1.1 Estudios de difusión *ex-vivo*

Se realizaron estudios de difusión utilizando como membrana la piel de ratón sin pelo (SKH1-HrBR), la cual constituye un modelo de piel adecuado como alternativa al uso de piel humana.

Variables experimentales comunes

Celda tipo: Flujo Continuo PermeGear ILC-07
Membrana de difusión: piel dorsal ratón sin pelo
Temperatura: 37° C
Concentración de principio activo en formulación donadora (C_{don_0}): 1250 µg/ml
Cantidad teórica aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,1 ml
Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 125 µg
Solución receptora: Tampón PBS pH=7,4
Flujo de líquido receptor (Frec): 1,5 ml/24 h
Duración del ensayo: 24 h
Número de celdas por ensayo (n): 6
Número de ensayos por formulación: 2 ($n_{totales}$ = 12 celdas)

A continuación, en la siguiente Tabla 24 se muestran las cantidades de principio activo calculadas a partir de las señales obtenidas en el análisis de las muestras de la membrana, piel de ratón sin pelo (HPLC):

Celda	mg de la fórmula aplicada	$\mu\text{g AmB } Q_0$	$\mu\text{g AmB en PIEL } Q_{\text{acum}}$	% AmB en PIEL Q_{acum}
I	105,40	131,75	0,70	0,53
II	104,12	130,15	0,62	0,47
III	105,33	131,66	0,79	0,60
IV	95,90	119,88	0,64	0,53
V	101,60	127,00	0,83	0,65
VI	73,80	92,25	0,58	0,62
VII	94,60	118,25	0,94	0,79
VIII	104,80	131,00	1,16	0,89
IX	96,80	121,00	0,48	0,39
		Media	0,75	0,61
		SD	0,20	0,14
		IC95	0,13	0,09

Tabla 24. Cantidades acumuladas de AmB en la membrana tras 24 horas.

Observaciones

El porcentaje medio de principio activo acumulado en las pieles tras 24 horas de exposición a la formulación en relación a las cantidades inicialmente dispuestas es de $0,61 \pm 0,09$ (I.C. 95 %). En el compartimento receptor se obtuvieron valores de AmB por debajo del límite de cuantificación ($< LC$).

4.2.3 Actividad antifúngica *in vitro*

En este ensayo de difusión en profundidad, los halos de inhibición obtenidos fueron muy claros y fácilmente medibles, como se observa en la siguiente Figura 56.

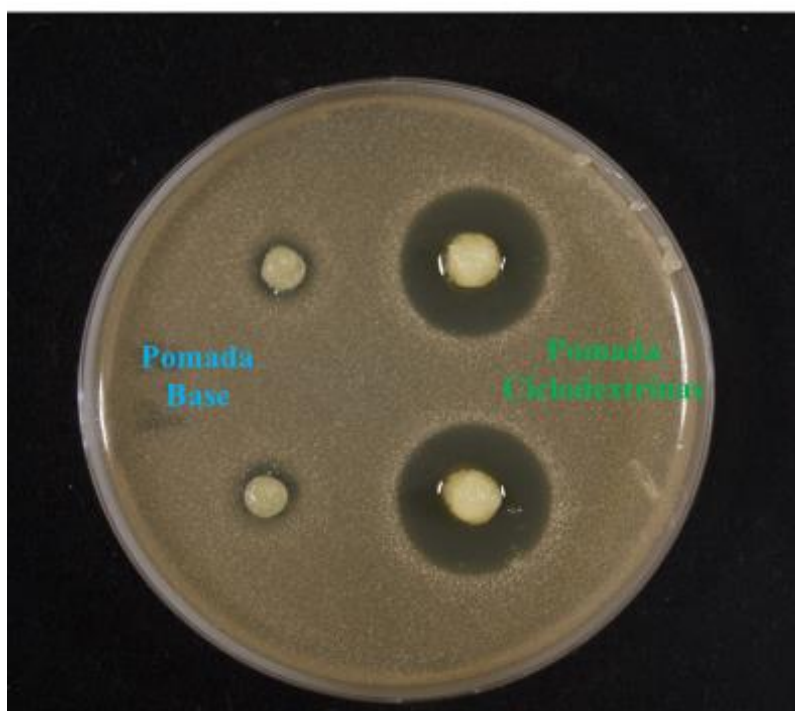


Figura 56. Actividad antifúngica de la Pomada Base (AmB) y la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) frente a *Candida krusei* ATCC 6258, en agar Müller Hinton, por ensayo de difusión en profundidad.

En la Tabla 25 se presenta el promedio de las medidas de los halos de inhibición obtenidos con cada cepa estudiada con su desviación estándar correspondiente.

MICROORGANISMO	Halo de inhibición (mm)
	Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD)
<i>Candida albicans</i> SC5314	21,4 ± 0,89
<i>Candida guilliermondii</i> 43L1-BEA+	27,80 ± 2,05
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	25,80 ± 1,64
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	24,60 ± 0,89
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	20,60 ± 1,14
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> By	25,75 ± 3,86

Tabla 25. Halos de inhibición (mm) y desviación estándar de la medida de los halos, obtenidos en el ensayo de difusión en profundidad de la actividad antifúngica de la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) sobre las distintas cepas.

Los resultados para este ensayo se observan claramente en una gráfica de barras. Las líneas horizontales de color rojo corresponden a los límites para considerar si una cepa es sensible, tiene sensibilidad intermedia o es resistente frente al fármaco en estudio.

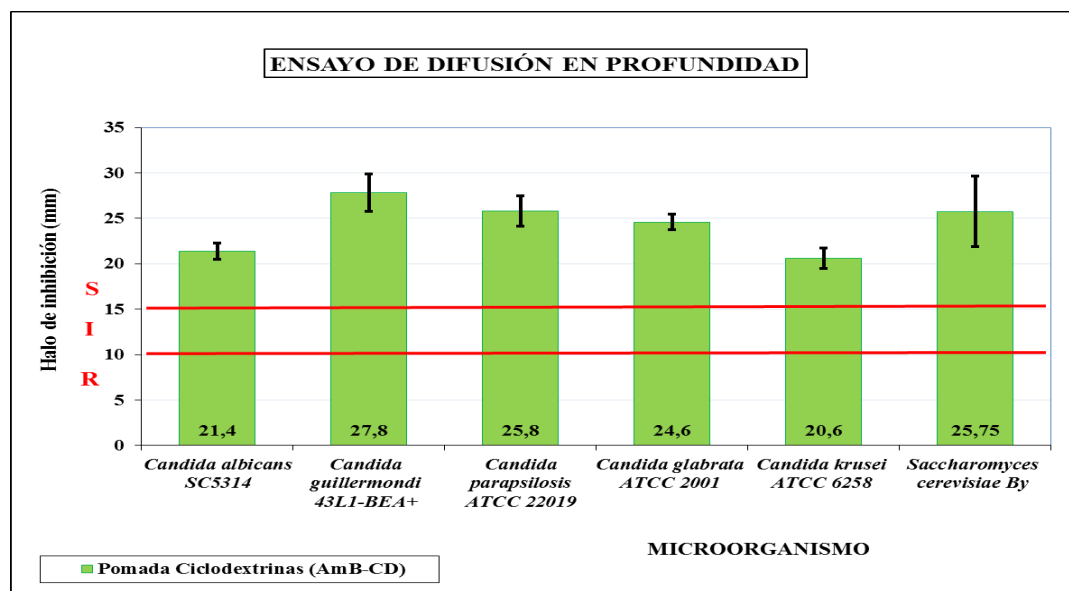


Figura 57. Promedio de las medidas de los halos de inhibición obtenidos con la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) y su desviación estándar correspondiente. Las líneas horizontales rojas determinan la sensibilidad: Resistente (R), si el halo de inhibición es menor de 10 mm. Intermedio (I), si la medida está entre 10 y 14 mm. Sensible (S), si la medida es mayor o igual a 15 mm (Espinell-Ingroff, *et al.*, 2008)

Observaciones

A partir de los datos obtenidos, se observa: primero, que todas las cepas son sensibles frente a nuestra formulación. Segundo, que la actividad antifúngica es muy superior (45-60 % mayor) a la anterior formulación, que podría deberse a un sinergismo entre la AmB y la CD. Tercero, que *C. krusei* ATCC 6258 sigue siendo la menos sensible, igual que ocurre en el caso anterior.

4.3 Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO)

Tras la elaboración, descrita en el apartado 3.2.4, se obtuvo una pomada de color amarillo un poco menos intenso que la anterior, sin olor, con textura granulosa igual que las pomadas anteriores.

Esta formulación tras un periodo de tiempo de un año a temperatura ambiente, sigue conservando aparentemente las mismas características anteriormente descritas: color, olor y textura, sin apreciarse fenómenos de separación de fases ni desestructuración de la formulación.



Figura 58. Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO).

4.3.1 Caracterización reológica

Extensibilidad

Resultados del análisis de extensibilidad de la Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO).

4. PARTE EXPERIMENTAL: Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO)

Peso (g)	Superficie (mm ²) ensayo 1	Superficie (mm ²) ensayo 2	Superficie (mm ²) ensayo 3	S media \pm SD (mm ²)
28	490,87	490,87	415,48	465,74 \pm 43,53
78	615,75	615,75	593,96	608,49 \pm 12,58
128	730,62	779,31	730,62	746,85 \pm 28,11
178	881,41	881,41	907,92	890,25 \pm 15,30
228	989,80	989,80	989,80	989,8 \pm 0,00
278	1046,35	1075,21	1046,35	1055,97 \pm 16,66
328	1164,16	1194,59	1134,11	1164,29 \pm 30,24

Tabla 26. Datos experimentales de extensibilidad Pomada Dimetilsulfóxido (AmB DMSO).

Informe del análisis de regresión de los datos extensiométricos y valor calculado del índice de extensibilidad (Ie), utilizando SIMFIT:

Results for Unweighted fitting (all s = 1)

Parameter	Value	Std. error	... 95% con. lim...	p
Intercept	4.325E+02	2.45E+01	3.81E+02 4.84E+02	0.000
Slope	2.635E+00	1.20E-01	2.38E+00 2.89E+00	0.000

(R-squared = 0.9621, R = 0.9808, p = 0.0000)

Analysis of Residuals

```

Analysis of residuals:    SSQ = 5.749E+04
Est. average % coeff.var. = 6.102
R-squared, cc(theory,data)^2 = 0.962
Largest Abs.rel.res. = 15.43 %
Smallest Abs.rel.res. = 0.01 %
Average Abs.rel.res. = 5.74 %
Abs.rel.res. in range 10-20 % = 19.05 %
Abs.rel.res. in range 20-40 % = 0.00 %
Abs.rel.res. in range 40-80 % = 0.00 %
Abs.rel.res. > 80 % = 0.00 %
No. res. < 0 (m) = 12
No. res. > 0 (n) = 9
No. runs observed (r) = 7
P(runs =< r : given m and n) = 0.040      Reject at 5% sig. level
5% lower tail point = 7
1% lower tail point = 5
P(runs =< r : given m plus n) = 0.058
P(signs =< least no. observed) = 0.664
Durbin-Watson test statistic = 0.705 <1.5, +ve serial correlation?
Shapiro-Wilks W (wtd. res.) = 0.950
Significance level of W = 0.344
Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 2.341E+02 ( 2.332E+02)

```

x-input	y-calculated	95% confidence limits	
2.000E+02	9.595E+02	9.338E+02	9.852E+02

El extensograma obtenido a partir de los datos extensiométricos medios, se recoge en la siguiente figura.

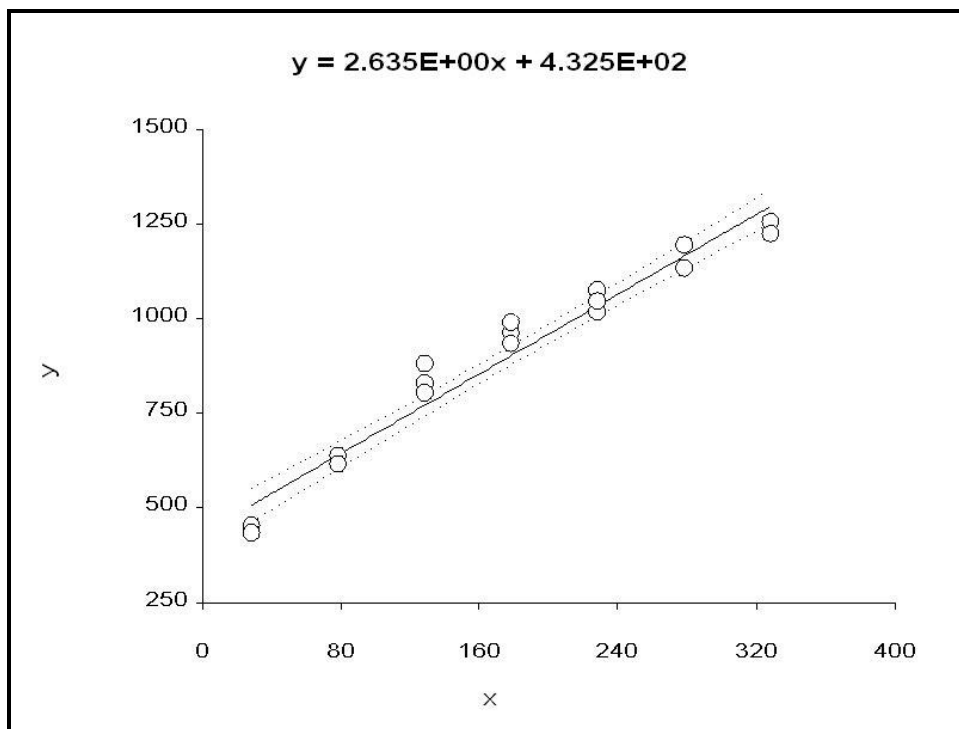


Figura 59. Extensograma Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO): datos medios \pm I.C. (95 %).

Según los datos obtenidos mediante el análisis de regresión (SIMFIT), el índice de extensibilidad (Ie) calculado es de $959,5 \pm 25,7 \text{ mm}^2$ (I.C. 95 %).

Viscosidad

Resultados del análisis de viscosimetría de la Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO).

Velocidad (RPM)	Torsión (%)	Viscosidad (Pa.s)	Fuerza de cizalla (D/cm ²)	Velocidad de cizalla (1/s)
0,00	-2,18	0,00	0,00	0,00
2,50	5,18	16,36	817,86	5,00
5,00	6,38	10,07	1006,59	10,00
7,50	5,67	5,98	896,50	15,00
10,00	6,21	5,03	1006,59	20,00
12,50	9,15	5,76	1439,11	25,00
15,00	9,07	4,53	1360,47	30,00
12,50	8,13	5,13	1281,83	25,00
10,00	9,40	7,39	1478,43	20,00
7,50	6,54	6,82	1022,32	15,00
5,00	7,25	11,40	1140,28	10,00
2,50	10,77	33,50	1690,76	5,00
0,00	10,35	0,00	0,00	0,00

Tabla 27. Datos experimentales de viscosidad Pomada Dimetilsulfóxido (AmB DMSO).

Representación gráfica de la fuerza de cizalla frente a la velocidad de cizalla:

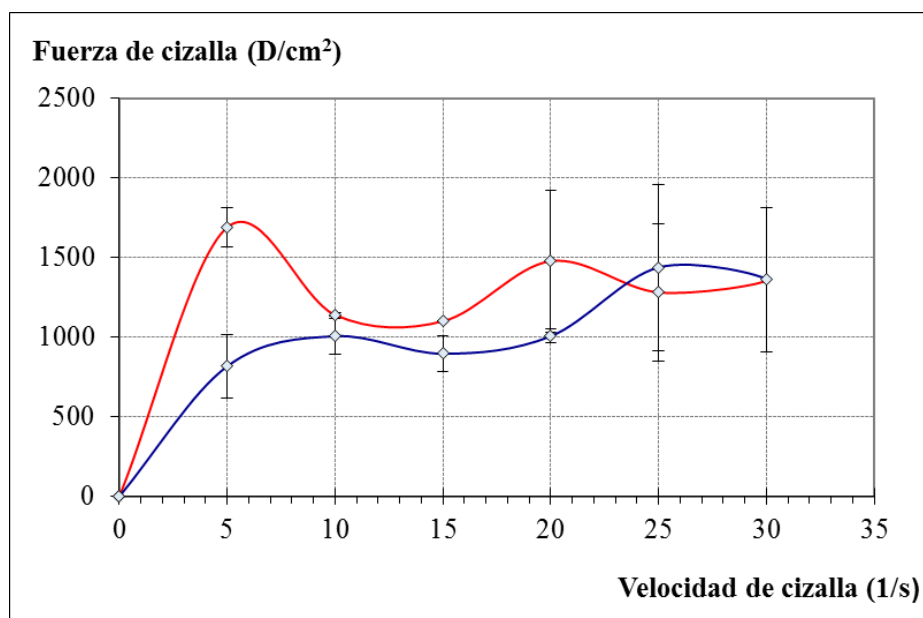


Figura 60. Reograma Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO).

Según los datos de la Tabla 27 se calculó el área bajo la curva tanto de la rampa de subida como de la rampa de bajada para obtener finalmente la tixotropía. En este caso, la tixotropía media fue de $38,68 \pm 3,83$ Pa (I.C. 95 %). Se realizó un ajuste por regresión lineal bi-logarítmica con los datos experimentales de la misma tabla y se obtuvo la consistencia media, $m = 1160,86 \pm 777,85$ (I.C. 95 %) y un índice de comportamiento de flujo por debajo de 1 ($n < 1$).

Observaciones

A partir del reograma y de los datos obtenidos, se observa un comportamiento pseudoplástico con un escaso grado de tixotropía. Presenta unos valores de extensibilidad mayores que las otras formulaciones por lo que su consistencia y viscosidad son menores.

4.1.1 Estudios de difusión *ex-vivo*

Se realizaron estudios de difusión utilizando como membrana la piel de ratón sin pelo (SKH1-HrBR), la cual constituye un modelo de piel adecuado como alternativa al uso de piel humana.

Variables experimentales comunes

Celda tipo: Flujo Continuo PermeGear ILC-07
Membrana de difusión: piel dorsal ratón sin pelo
Temperatura: 37° C
Concentración de principio activo en formulación donadora (C_{don_0}): 1250 µg/ml
Cantidad teórica aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,1 ml
Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 125 µg
Solución receptora: Tampón PBS pH=7,4
Flujo de líquido receptor (Frec): 1,5 ml/24 h
Duración del ensayo: 24 h
Número de celdas por ensayo (n): 6
Número de ensayos por formulación: 2 ($n_{totales}$ = 12 celdas)

A continuación, en la siguiente Tabla 28 se muestran las cantidades de principio activo calculadas a partir de las señales obtenidas en el análisis de las muestras de la membrana, piel de ratón sin pelo (HPLC):

Celda	mg de la fórmula aplicada	µg AmB Q ₀	µg AmB en PIEL Q _{acum}	% AmB en PIEL Q _{acum}
I	92,50	115,63	0,72	0,63
II	100,00	125,00	0,99	0,79
III	89,80	112,25	0,76	0,67
IV	99,50	124,38	0,73	0,58
V	96,70	120,88	0,74	0,61
VI	83,44	104,30	0,60	0,58
VII	93,70	117,13	0,79	0,67
VIII	97,40	121,75	0,34	0,28
IX	107,70	134,63	0,74	0,55
X	93,50	116,88	0,80	0,69
XI	88,20	110,25	0,71	0,65
		Media	0,72	0,61
		SD	0,15	0,12
		IC95	0,09	0,07

Tabla 28. Cantidades acumuladas de AmB en la membrana tras 24 horas.

Observaciones

El porcentaje medio de principio activo acumulado en las pieles tras 24 horas de exposición a la formulación en relación a las cantidades inicialmente dispuestas es de $0,61 \pm 0,07$ (I.C. 95 %). En el compartimento receptor no se detectó AmB, valores por debajo del límite de cuantificación (< LC).

4.1.3 Actividad antifúngica *in vitro*

En este caso no se realizaron los ensayos de actividad antifúngica con la Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO), ya que la concentración del DMSO en esta formulación [12,5 %], inhibe -por sí sola- el crecimiento de los microorganismos ensayados (Randhawa, 2008), por lo que no se podría diferenciar la actividad antifúngica debida a la AmB de la del DMSO, en dicha formulación.

4.4 Análisis comparativo de los datos

Los caracteres organolépticos han resultado ser muy parecidos, apenas se aprecia una diferencia en cuanto a la tonalidad del color amarillo de la Pomada Base con respecto a las otras dos, como se observa en la siguiente Figura 61.



Figura 61. Pomada Base (AmB), Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) y Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO).

4.4.1 Caracterización reológica

Extensibilidad

Respecto a las características de extensibilidad, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas (SIMFIT).

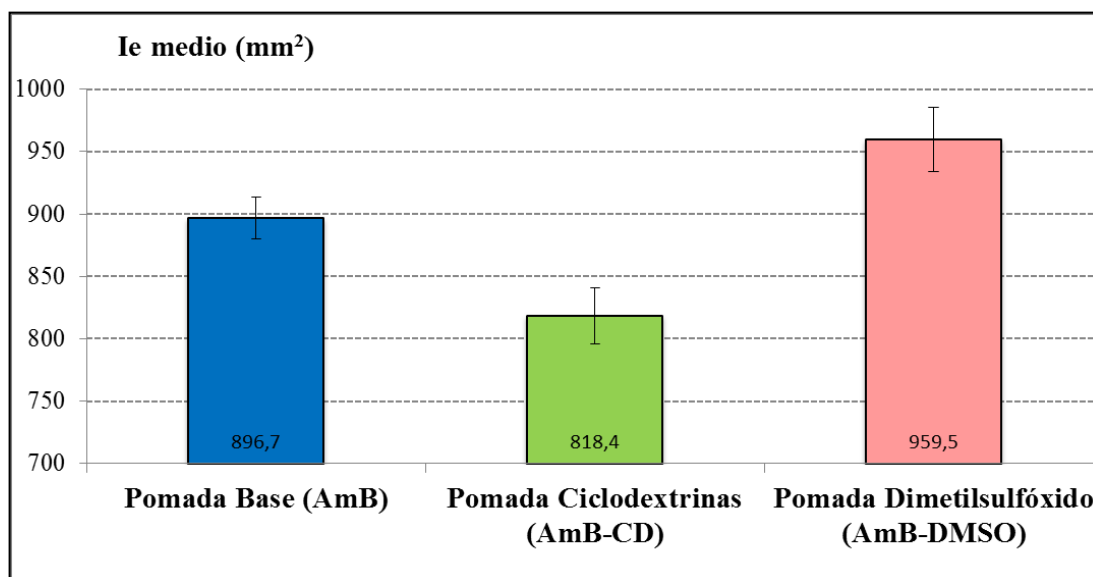


Figura 62. Representación gráfica de los índices de extensibilidad. Datos medios \pm IC (95 %).

Observaciones

La Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO) es la que tiene mayor extensibilidad seguida de la Pomada Base (AmB) y por último la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD). Estas diferencias se deben al efecto de la incorporación de un líquido (DMSO) en la Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO) que aumenta la extensibilidad en comparación con la Pomada Base (AmB). Por otro lado, en la formulación con CD (Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD)) el efecto aglutinante de estos hidratos de carbono disminuye la extensibilidad en relación a la Pomada Base (AmB).

Viscosidad

Las diferencias encontradas en cuanto a la viscosidad de las formulaciones son estadísticamente significativas ($p < 0,01$ y $F > F_{\text{crítico}}$, ANOVA).

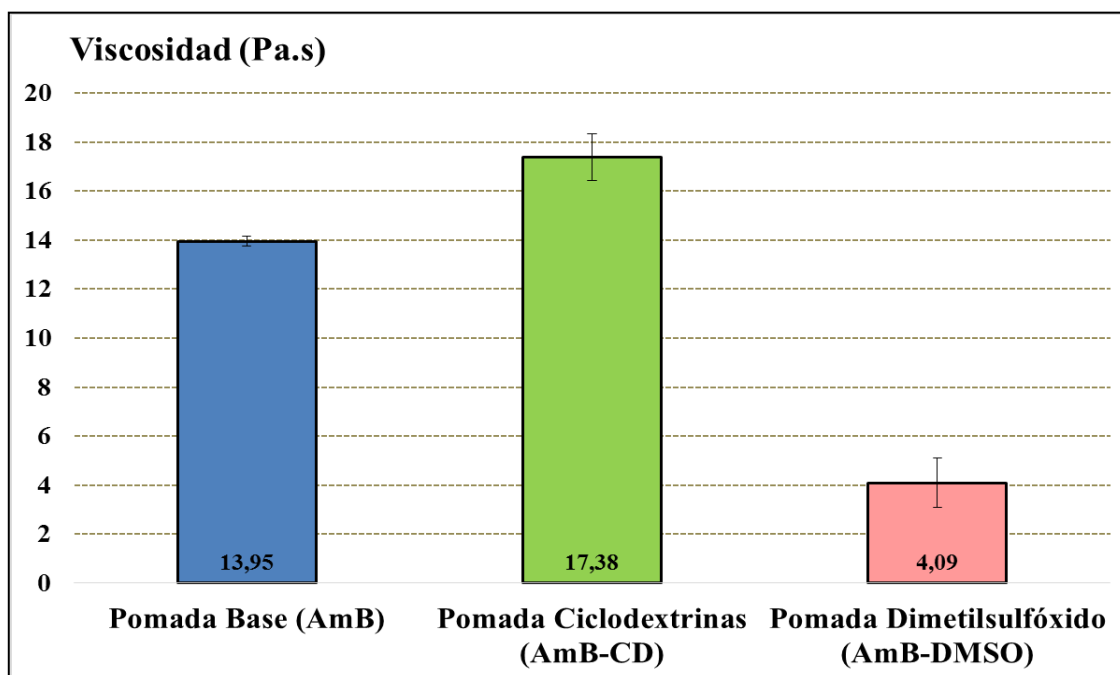


Figura 63. Representación gráfica de la viscosidad. Datos medios \pm I.C. (95 %).

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS DATOS DE VISCOSIDAD A 15 RPM

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	278,21107	2	139,1055329	441,88373	2,37386E-06	5,786135043
Dentro de los grupos	1,574006	5	0,314801209			
Total	279,78507	7				

Tabla 29. Análisis de varianza de los datos de viscosidad a 15 rpm.

Observaciones

En general se aprecia que una disminución de la extensibilidad puede asociarse a un aumento en la viscosidad de las formulaciones que a su vez depende de los excipientes empleados. Este hecho puede tener repercusiones importantes en lo que concierne a la correcta aplicación de la fórmula sobre la superficie de la piel.

4. PARTE EXPERIMENTAL: Análisis comparativo de los datos

En cuanto a la **tixotropía** las diferencias no son estadísticamente significativas como se observa en el análisis estadístico ANOVA ($p > 0,01$ y $F < F_{\text{crítico}}$).

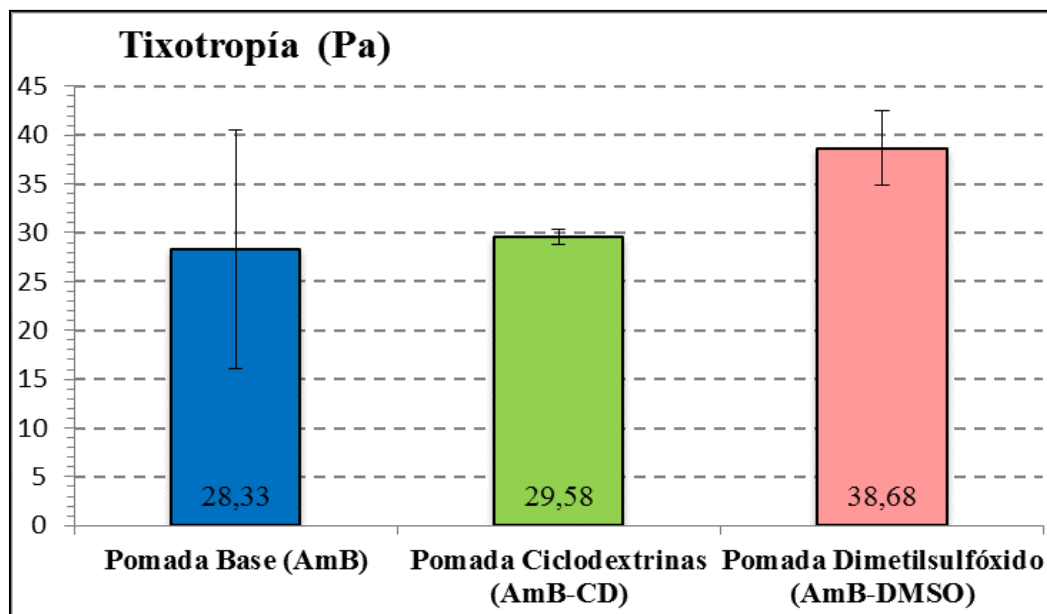


Figura 64. Representación gráfica de la tixotropía. Datos medios \pm I.C. (95 %)

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS DATOS DE TIXOTROPÍA (Pa)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	127,63858	2	63,81929015	2,21948	0,256102545	9,552094496
Dentro de los grupos	86,262567	3	28,75418888			
Total	213,90115	5				

Tabla 30. Análisis de varianza de los datos de tixotropía (Pa).

Observaciones

Las tres formulaciones presentan una baja tixotropía. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones ensayadas por ello se repitió el análisis de varianza sin incluir a la Pomada Base (AmB).

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS DATOS DE TIXOTROPÍA (Pa): Pomada CD y Pomada DMSO

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	82,801022	1	82,80102158	20,8249	0,044816074	18,51282051
Dentro de los grupos	7,9521234	2	3,976061695			
Total	90,753145	3				

Tabla 31. Análisis de varianza de los datos de tixotropía (Pa) entre la Pomada CD (AmB CD) y la Pomada DMSO (AmB-DMSO).

Observaciones

En este caso, entre la Pomada CD (AmB-CD) y la Pomada DMSO (AmB-DMSO) si existen diferencias estadísticamente significativas.

Por otra parte, las diferencias encontradas en la *consistencia* son estadísticamente significativas ($p < 0,01$ y $F > F_{\text{crítico}}$, ANOVA).

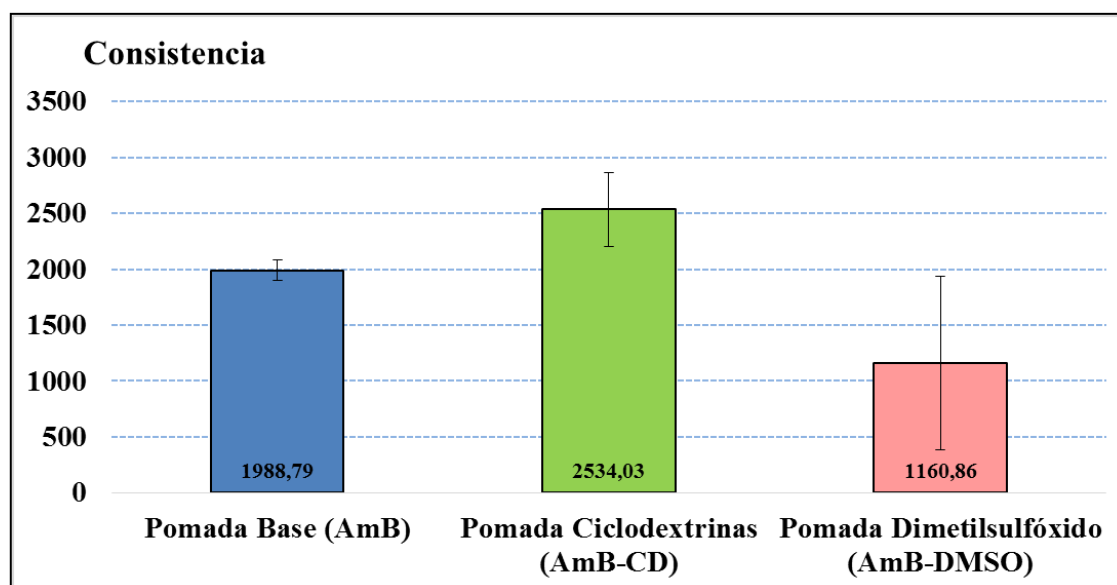


Figura 65. Representación gráfica de la consistencia. Datos medios \pm I.C. (95 %).

ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PARÁMETRO CONSISTENCIA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4525444,73	2	2262722,365	9,0412	0,004760957	3,982297957
Dentro de los grupos	2752948,65	11	250268,0595			
Total	7278393,38	13				

Tabla 32. Análisis de varianza del parámetro consistencia.***Observaciones***

Los resultados mostrados en las Figuras 62-65 demuestran la relación observada entre las características de extensibilidad, viscosidad, tixotropía y consistencia para las tres formulaciones estudiadas. Como suele ser habitual la formulación con menos consistencia (la que contiene el excipiente líquido DMSO) es la que tiene mayor extensibilidad y menor viscosidad. El comportamiento opuesto es el que se observa en la formulación con ciclodextrinas; probablemente el carácter aglutinante de este excipiente es el responsable de su mayor consistencia y viscosidad y menor extensibilidad.

4.4.2 Estudios de difusión: absorción de anfotericina B a través de la piel

El presente trabajo tiene como objetivo primordial el desarrollo y optimización de una fórmula de uso tópico con AmB en forma de pomada para el tratamiento local de infecciones fúngicas a nivel superficial. Por este motivo es de vital interés la penetración de AmB en la piel, ya que es el órgano diana. Para ello se analizaron los contenidos de principio activo en las membranas tras 24 horas de ensayo de difusión en idénticas condiciones con cada pomada y se compararon con una solución control (Solución 2: AmB-CD (H₂O)) de la misma concentración. Los resultados obtenidos de porcentaje medio de AmB acumulada en la membrana fueron los siguientes:

Formulación	Q _{acum} (%)	IC (95 %)
Pomada Base (AmB)	0,15	0,06
Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD)	0,61	0,09
Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO)	0,61	0,07
Control: "Solución 2 (AmB-CD)"	0,48	0,21

Tabla 33. Porcentajes medios de AmB acumulado en la membrana \pm I.C. (95 %).

Observaciones

Al comparar los contenidos de principio activo acumulado en la piel de ratón sin pelo tras 24 horas, se comprueba que el porcentaje medio acumulado en los ensayos con la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) y la Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO) fueron superiores a los de la Pomada Base (AmB). Podemos confirmar que el complejo

4. PARTE EXPERIMENTAL: Análisis comparativo de los datos

AmB-CD le concede a la formulación un aumento de la capacidad de penetración con respecto a la formulación del principio activo sin complejo. Este aumento del efecto promotor es comparable con el que se produce al incorporar el excipiente DMSO a la pomada.

Los análisis de varianza realizados muestran que las diferencias entre los resultados obtenidos con todas las formulaciones:

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS % ACUMULADOS EN PIEL

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1,39997513	3	0,466658375	11,740033	1,78907E-05	2,87418748
Dentro de los grupos	1,39122629	35	0,039749322			
Total	2,79120141	38				

Tabla 34. Análisis de varianza de los % acumulados en piel.

ANOVA: $p < 0,01$ y $F > F_{\text{crítico}}$, por lo que las diferencias entre todas las formulaciones se consideran estadísticamente muy significativas.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	<i>Pomada AmB</i>	<i>Pomada AmB-CD</i>		<i>Pomada AmB</i>	<i>Pomada AmB-DMSO</i>
Media	0,151643144	0,609433843	Media	0,15164314	0,609503848
Varianza	0,0088155	0,023622036	Varianza	0,0088155	0,016215691
Observaciones	9	9	Observaciones	9	11
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	13		Grados de libertad	18	
Estadístico t	-7,625429179		Estadístico t	-9,24329338	
P(T<=t) una cola	1,88252E-06		P(T<=t) una cola	1,4778E-08	
Valor crítico de t (una cola)	1,770933396		Valor crítico de t (una cola)	1,73406361	
P(T<=t) dos colas	3,76504E-06		P(T<=t) dos colas	2,9555E-08	
Valor crítico de t (dos colas)	2,160368656		Valor crítico de t (dos colas)	2,10092204	

Tabla 35. Análisis estadístico t de Student.

Al comparar la Pomada Base (AmB) con la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) y la Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO), se observa que las diferencias existentes entre ellas son estadísticamente muy significativas ($p < 0,01$ y $t_{\text{estadístico}} > t_{\text{crítico (dos colas)}}$).

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Pomada AmB	Solución AmB-CD		Pomada AmB-CD	Pomada AmB-DMSO
Media	0,151643144	0,476209217	Media	0,609433843	0,609503848
Varianza	0,0088155	0,121196136	Varianza	0,023622036	0,016215691
Observaciones	9	9	Observaciones	9	11
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9		Grados de libertad	16	
Estadístico t	-2,700432114		Estadístico t	-0,001093444	
P(T<=t) una cola	0,01218822		P(T<=t) una cola	0,499570538	
Valor crítico de t (una cola)	1,833112933		Valor crítico de t (una cola)	1,745883676	
P(T<=t) dos colas	0,02437644		P(T<=t) dos colas	0,999141076	
Valor crítico de t (dos colas)	2,262157163		Valor crítico de t (dos colas)	2,119905299	

Tabla 36. Análisis estadístico t de Student.

Al comparar la Pomada Base (AmB) con la Solución Control (AmB-CD), se observa que las diferencias existentes entre ellas son estadísticamente muy significativas ($p < 0,01$ y $t_{\text{estadístico}} > t_{\text{crítico (dos colas)}}$). Sin embargo, entre la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) y la Pomada Dimetilsulfóxido (AmB-DMSO) no existen diferencias significativas ($p > 0,01$ y $t_{\text{estadístico}} < t_{\text{crítico (dos colas)}}$).

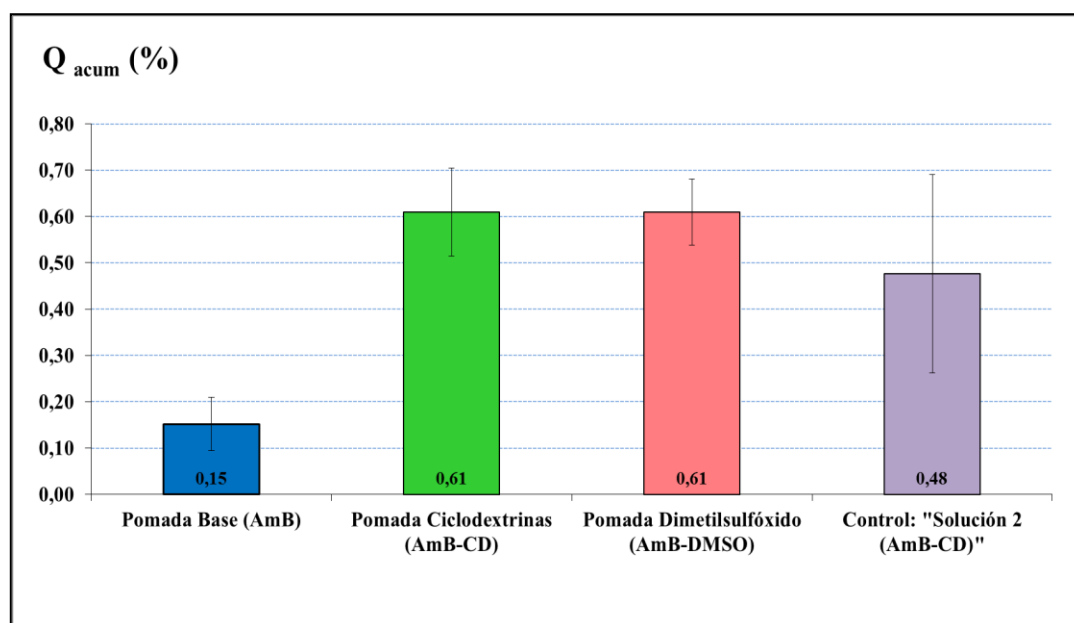


Figura 66. Porcentajes de AmB acumulados en la membrana a partir de cada formulación. Datos medios \pm I.C (95 %).

Conclusiones parciales

Por los datos obtenidos en el estudio de permeabilidad podemos concluir que en nuestras condiciones experimentales las CD tienen un efecto promotor de penetración parecido al del DMSO.

Por otra parte, al querer conseguir un efecto local también es de vital importancia la no difusión de AmB al compartimento receptor, para evitar los posibles efectos secundarios a nivel sistémico. Los resultados obtenidos del contenido de AmB acumulado tras 24 horas de ensayo en el compartimento receptor a través de la piel de ratón sin pelo muestran que en ningún caso se detectó la presencia de AmB (valores por debajo del límite de cuantificación; < LC). Resultado lógico debido a gran tamaño de la molécula de la AmB. Por lo que se puede concluir que presentan unos valores de penetración en piel y de pérdida de principio activo al torrente circulatorio muy prometedores para el tratamiento de infecciones fúngicas locales en la piel.

4.4.3 Actividad antifúngica *in vitro*

Para determinar la actividad antifúngica *in vitro*, se realizaron dos tipos de métodos de sensibilidad: *ensayo de difusión en profundidad* con las pomadas correspondientes y *test de difusión en disco* con una serie de soluciones que se utilizaron como control.

Ensayo de difusión en profundidad

Las formulaciones ensayadas mediante esta técnica fueron la Pomada Base (AmB) y la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD), cuyos resultados se pueden observar en la siguiente Tabla 37.

MICROORGANISMO	Halo de inhibición (mm)	
	Pomada Base (AmB)	Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD)
<i>Candida albicans</i> SC5314	13 ± 1,87	21,4 ± 0,89
<i>Candida guilliermondi</i> 43L1-BEA+	12,20 ± 1,92	27,80 ± 2,05
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	14,40 ± 0,55	25,80 ± 1,64
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	13,40 ± 1,67	24,60 ± 0,89
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	7,40 ± 0,55	20,60 ± 1,14
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> By	10 ± 1,83	25,75 ± 3,86

Tabla 37. Halos de inhibición (mm) y su correspondiente desviación estándar, obtenidos en el ensayo de difusión en profundidad con la Pomada Base (AmB) y la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) sobre las distintas cepas.

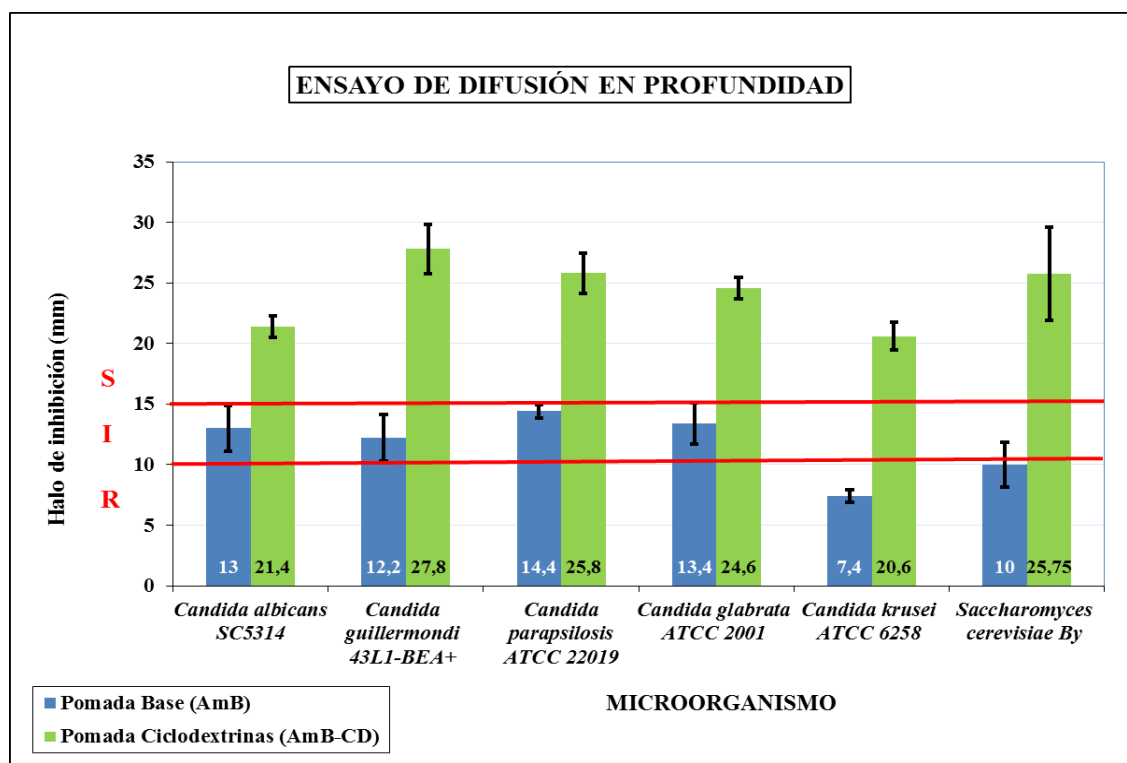


Figura 67. Promedio de las medidas de los halos de inhibición obtenidos con la Pomada Base (AmB) y la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) y su desviación estándar correspondiente. Las líneas horizontales rojas determinan la sensibilidad: Resistente (R), si el halo de inhibición es menor de 10 mm. Intermedio (I), si la medida está entre 10 y 14 mm. Sensible (S), si la medida es mayor o igual a 15 mm (Espinel-Ingroff, *et al.*, 2008).

Observaciones parciales

La acción antifúngica de la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) es del 45-60 % mayor que la de la Pomada Base (AmB), siendo la primera activa frente a todas las cepas ensayadas. En ambas formulaciones la carga final utilizada en el ensayo fue de 125 µg de AmB, (equivalente a [1,25 mg/ml]).

Así mismo, se observaron diferencias interespecíficas. En este caso, la formulación con ciclodextrinas (Pomada Ciclodextrinas) es más activa frente a *C. guilliermondii* 43L1-BEA+, seguida de *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *S. cerevisiae* By. Y por el contrario, presenta menor actividad frente a *C. albicans* SC5314 y *C. krusei* ATCC 6258, aun así sigue siendo mucho más activa

que la otra formulación (Pomada Base). Esto , que potencie la acción antifúngica de la AmB.

Por otra parte, no se obtuvo ningún halo de inhibición con el excipiente Orabase® solo, por lo que no tiene actividad antifúngica.

Test de difusión en disco

Al igual que los ensayos anteriores, los halos de inhibición obtenidos fueron muy claros y fácilmente medibles, como se observa en la siguiente Figura 68.

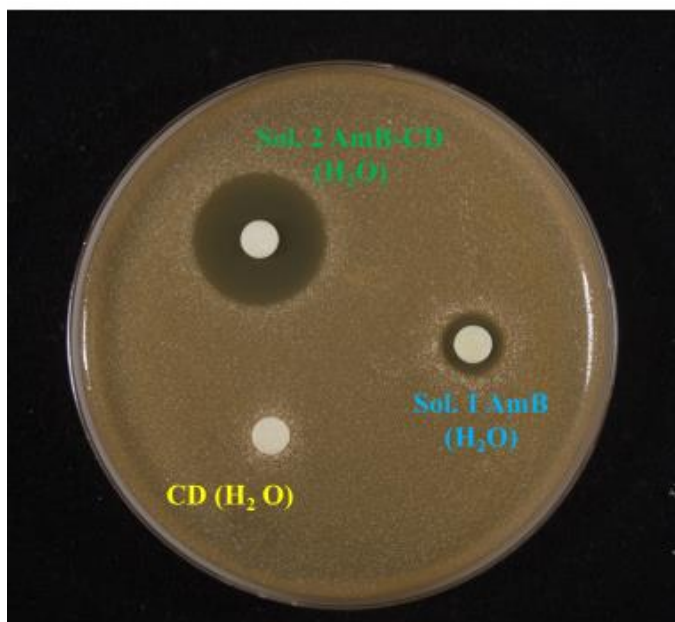


Figura 68. Actividad antifúngica de la Suspensión 1 (25 µg de AmB en H₂O), Solución 2 (25 µg AmB - 2500 µg CD en H₂O) y CD en H₂O (2500 µg CD) frente a *Candida krusei* ATCC 6258, en agar Müller Hinton, por test de difusión en disco. Discos (6 mm) impregnados con 20 µl de las formulaciones, respectivamente.

En la siguiente tabla se observan los datos obtenidos tras haber medido los halos resultantes de los ensayos.

MICROORGANISMO	Halo de inhibición (mm)	
	Sol. 1 AmB (H ₂ O)	Sol. 2 AmB-CD (H ₂ O)
<i>Candida albicans</i> SC5314	18,4 ± 3,05	29,00 ± 2,55
<i>Candida guilliermondi</i> 43L1-BEA+	19,67 ± 5,86	30,00 ± 2,12
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	15,67 ± 3,06	25,67 ± 3,79
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	20,00 ± 1,73	28,67 ± 1,15
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	13,33 ± 2,08	21,00 ± 3,61
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> By	21,67 ± 3,51	31,67 ± 2,89

Tabla 38. Halos de inhibición (mm) y desviación estándar de la medida de los halos, obtenidos en el test de difusión en disco con la Suspensión 1 (AmB en H₂O) y la Solución 2 (AmB-CD en H₂O) sobre las distintas cepas.

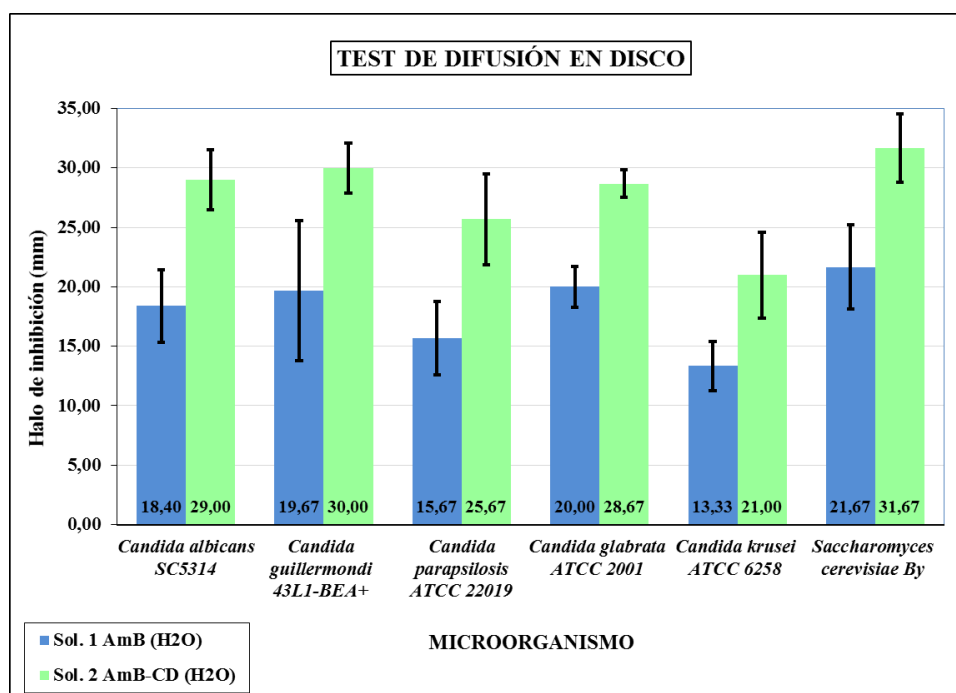


Figura 69. Promedio de las medidas de los halos de inhibición obtenidos con la Suspensión 1 (AmB en H₂O) y la Solución 2 (AmB-CD en H₂O) y su desviación estándar correspondiente, sobre las distintas cepas.

Observaciones parciales

En las soluciones control, el efecto antifúngico se ve aumentado en la formulación con CD, al igual que ocurre en las formulaciones estudiadas (pomadas),

como se ha descrito previamente. La carga final utilizada en el ensayo por ambas soluciones fue de 25 μ g de AmB (equivalente a [1,25 mg/ml]).

En este caso, las diferencias interespecíficas no son tan notables, a excepción de *C. krusei* ATCC 6258, que es la especie menos sensible a este antifúngico.

Se realizaron más ensayos siguiendo la misma técnica.

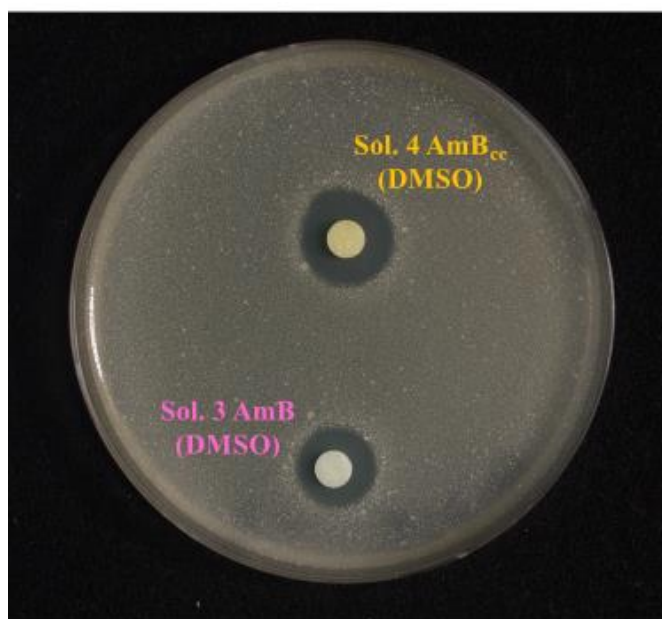


Figura 70. Actividad antifúngica de la Solución 3 (25 μ g AmB en DMSO) y Solución 4 (125 μ g AmB en DMSO, AmBcc) frente a *Candida krusei* ATCC 6258, en agar Mueller Hinton, por test de difusión en disco. Discos (6 mm) impregnados con 20 μ l de las formulaciones, respectivamente.

En la siguiente tabla se observan los datos obtenidos tras haber medido los halos resultantes de los ensayos.

MICROORGANISMO	Halo de inhibición (mm)	
	Sol. 3 AmB (DMSO)	Sol. 4 AmBcc (DMSO)
<i>Candida albicans</i> SC5314	18,50 ± 0,71	14,00 ± 1,41
<i>Candida guilliermondi</i> 43L1-BEA+	21,50 ± 0,71	23,00 ± 0
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	20,00 ± 1,41	21,50 ± 0,71
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	19,00 ± 0	20,00 ± 0
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	12,50 ± 0,71	14,50 ± 0,71
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> By	21,00 ± 0	23,50 ± 0,71

Tabla 39. Halos de inhibición (mm) y desviación estándar de la medida de los halos, obtenidos en el test de difusión en disco con la Solución 3 (AmB en DMSO) y Solución 4 (AmBcc en DMSO) sobre las distintas cepas.

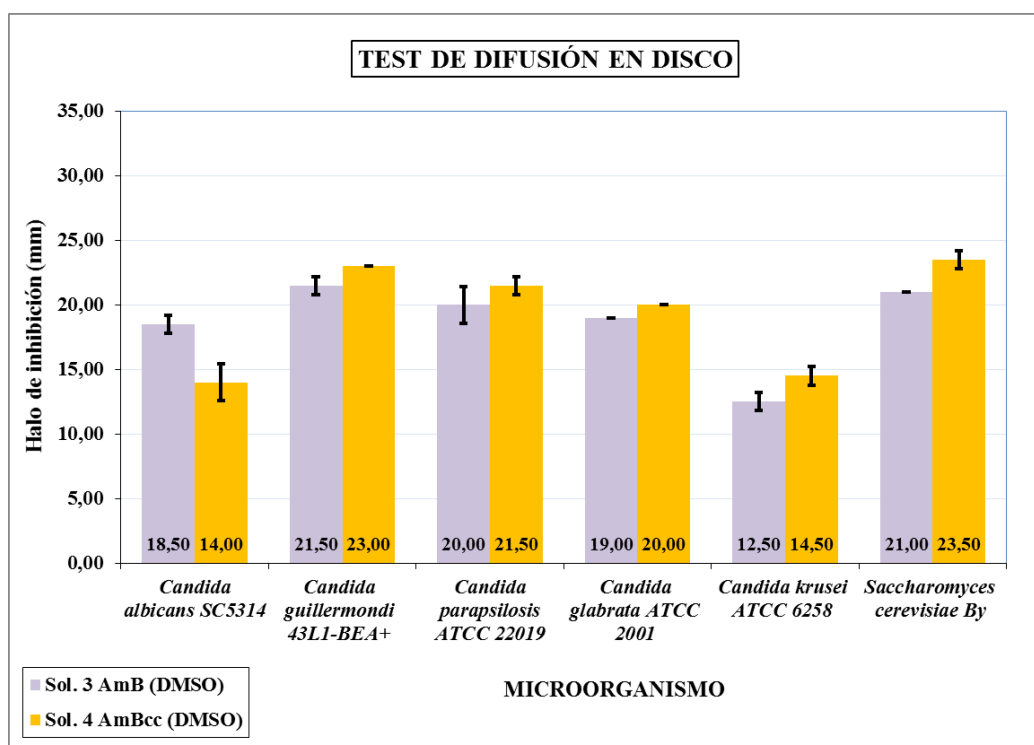


Figura 71. Promedio de las medidas de los halos de inhibición obtenidos con la Solución 3 (AmB en DMSO) y Solución 4 (AmBcc en DMSO) y su desviación estándar correspondiente, sobre las distintas cepas.

Observaciones parciales

Las diferencias no son significativas para las distintas soluciones en las que la carga final de AmB para la Solución 3 fue de 25 μg (equivalente a [1,25 mg/ml]), y en la Solución 4 fue de 125 μg (equivalente a [6,25 mg/ml]).

En ningún caso se obtuvo halo de inhibición con discos impregnados con CD (H_2O), ni con DMSO.

Se realizó un último ensayo comparativo utilizando otro disco de mayor tamaño y por lo tanto mayor volumen de inoculación, con la misma solución.



Figura 72. Actividad antifúngica de la Solución 3 (25 y 125 μg AmB) frente a *Candida krusei* ATCC 6258, en agar Müller Hinton, por test de difusión en disco. Discos de 6 y 12 mm impregnados con 20 y 100 μl de las formulaciones, respectivamente.

4. PARTE EXPERIMENTAL: Análisis comparativo de los datos

MICROORGANISMO	Halo de inhibición (mm)	
	Sol. 3 AmB (DMSO). Disco 6 mm	Sol. 3 AmB (DMSO). Disco 12 mm
<i>Candida albicans</i> SC5314	18,50	27,00
<i>Candida guilliermondi</i> 43L1-BEA+	21,50	29,00
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	20,00	29,00
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	19,00	29,00
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	12,50	23,00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> By	21,00	31,00

Tabla 40. Halos de inhibición (mm) y desviación estándar de la medida de los halos, obtenidos en el test de difusión en disco con la Solución 3 (AmB en DMSO) sobre discos de 6 y 12 mm, frente a las distintas cepas.

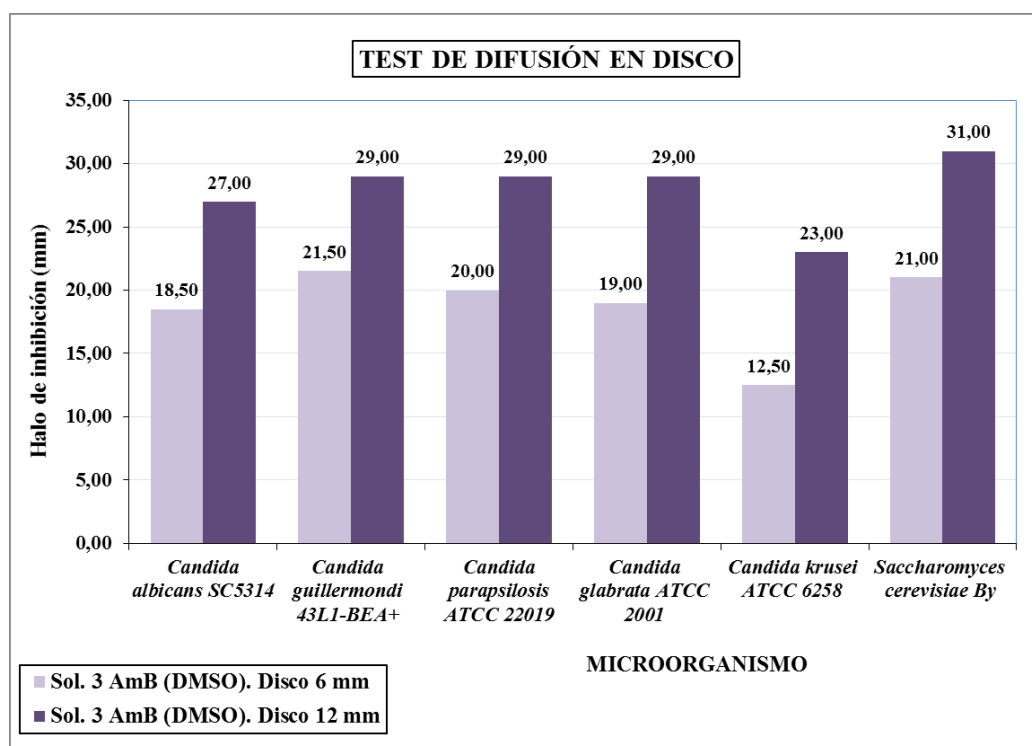


Figura 73. Promedio de las medidas de los halos de inhibición obtenidos con la Solución 3 (AmB en DMSO) sobre discos de 6 y 12 mm, y su desviación estándar correspondiente, frente a las distintas cepas.

Observaciones parciales

Los resultados obtenidos demuestran que a mayor superficie de contacto, y por lo tanto mayor carga, se obtienen halos de inhibición mayores, como cabría esperar. Para el disco de 6 mm la carga final de AmB fue de 25 µg, (equivalente a [1,25 mg/ml]), y para el disco de 12 mm fue de 125 µg, (equivalente a [1,25 mg/ml]).

Como en el resto de los ensayos anteriores, las formulaciones presentan menos actividad frente a *C. krusei* ATCC 6258. En el resto de cepas la sensibilidad es muy similar.

Observaciones generales

Las CD potencian el efecto antifúngico de la AmB, aumentando su actividad. Por lo que, la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) es la que presenta mayor actividad antifúngica frente a todas las cepas estudiadas.

En las pomadas ensayadas existen diferencias interespecíficas significativas para todas las cepas estudiadas, siendo *C. krusei* ATCC 6258 la que presenta menor sensibilidad frente a nuestro principio activo en todos los casos.

Las Soluciones 3 (carga final 25 µg) y 4 (carga final 125 µg), no presentan diferencias significativas en cuanto a su actividad antifúngica, dando halos de inhibición similares. Esto podría deberse a un impedimento físico de difusión de la molécula química en el medio de cultivo sólido, a partir de una determinada concentración de la misma y en función de su tamaño molecular.

5. CONCLUSIONES

1. Se han preparado en frío diferentes pomadas hidrófobas con AmB utilizando como excipiente Orabase®. Se estudia el efecto de disolución de la AmB empleando como vehículos agua, DMSO y complejos con γ -CD. Las formulaciones del presente trabajo han sido caracterizadas desde un punto de vista organoléptico sin cambios aparentemente significativos entre ellas, presentando un color amarillento, sin olor y una textura granulosa característica del propio Orabase®.

2. Las formulaciones estudiadas han sido caracterizadas desde un punto de vista reológico, incluyendo las propiedades de extensibilidad, viscosidad, consistencia y tixotropía. Cuando se utiliza un vehículo líquido (DMSO) en la pomada, se obtiene menor consistencia y viscosidad y mayor extensibilidad. El efecto contrario se observa al utilizar γ -CD como vehículo debido a su acción aglutinante.

3. Las tres formulaciones ensayadas presentan un comportamiento pseudoplástico con un índice de comportamiento de flujo menor a uno. Todas las pomadas estudiadas presentan una baja tixotropía aunque la pomada con DMSO presenta una mayor dificultad en la recuperación de su estructura.

4. Los resultados obtenidos con los ensayos de difusión nos han permitido detectar una acumulación de principio activo en la piel de ratón sin pelo durante 24 horas, por parte de todas las formulaciones estudiadas (pomadas y solución control). La Pomada Base (AmB) es la que presenta menor acumulación de AmB en la piel. Los porcentajes medios acumulados en los ensayos con las formulaciones con CD (Pomada y Solución Control) y DMSO fueron superiores al de la Pomada Base (AmB). La γ -CD en estas formulaciones tienen un efecto promotor de penetración similar al del DMSO a igual concentración.

5. Los resultados obtenidos del contenido de AmB acumulado después de 24 horas de ensayo en el compartimento receptor a través de la piel de ratón sin pelo demuestran que en ningún caso se detectó la presencia de AmB. Por esta razón se puede concluir que las formulaciones con γ -CD y DMSO son eficaces para vectorizar el principio activo en la piel y evitar efectos secundarios por absorción sistémica por lo que son prometedoras para el tratamiento de infecciones fúngicas locales en la piel.

5. CONCLUSIONES

6. En cuanto a los ensayos de eficacia microbiológica la Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD) presenta siempre una acción antifúngica entre 45-60 % más activa que la Pomada Base (AmB) dependiendo de la cepa, siendo activa frente a todas las levaduras ensayadas. Se demuestra que las γ -CD potencian el efecto antifúngico de la AmB, aumentando su actividad.

7. En función de todos los resultados obtenidos, seleccionamos a la **Pomada Ciclodextrinas (AmB-CD)** como la formulación más eficaz y segura siendo el candidato más adecuado para continuar con otros estudios.

6. BIBLIOGRAFÍA

Agatensi L, Farnchi F, Mondello F, Bevilacqua RL, Ceddia T, De Bernardis F, *et al.* Vaginopathic and proteolytic *Candida* species in outpatients attending a gynecology clinic. *J Clin Pathol.* 1991;44:826-830.

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Catálogo de Medicamentos Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos [Internet]. España: AEMPS; 2010 [citado 1 de Feb de 2015]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/>

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica o resumen de las características del producto [Internet]. España: AEMPS; 2014 [citado 27 de Abril de 2015]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm>

Aguirre-Acosta E, Ulloa M, Aguilar S, Cifuentes J, Valenzuela R. Biodiversidad de hongos en México. *Rev Mex Biodiv* [Internet]. 2014[citado 2 de septiembre de 2015];85(Suppl 1):S76-S81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7550/rmb.33649>

Alou L, Maestre JR, Moreno R. Consumo de antifúngicos de uso tópico en España. *Rev Esp Quimioter.* 2001;14:340-4.

Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol.* 2010; 28(2): 197-201.

Aramwit P, Yu BG, Lavasanifar A, Samuel J, Kwon GS. The effect of serum albumin on the aggregation state and toxicity of amphotericin B. *J Pharm Sci.* 2000;89:1589-93.

Araújo A, Sayuri S, Fiorini A, Barufatti A, Estivalet TI, Pires KM. Genotypic variability and antifungal susceptibility of *Candida tropicalis* isolated from patients with candiduria. *Rev Iberoam Micol.* 2015;32(3):153-8.

Arco J. Pomadas y pastas. En: Grupo de formulación del COF de Bizkaia. Formulación Magistral de Medicamentos. 5ª ed. Bilbao: Colegio Oficial de Farmacéuticos de Bizkaia; 2004. p.153-68.

Armengot-Carbó M. Formación del estrato córneo: ensamblaje de la envoltura cornificada y biología de la filagrina. *Piel* [Internet]. 2014 [citado el 23 de marzo del 2014];29(9):581-86. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.piel.2014.05.009>

Armegot-Carbo M, Hernández-Martín A, Torrelo A. The role of filaggrin in the skin barrier and disease development. *Actas Dermosifiliogr*. 2014;106(2):86-95.

Anigbogu ANC. Fourier transform Raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethyl sulfoxide and human stratum corneum. *Int J Pharm*. 1995;125:265–282.

Antoniskis D, Larsen RA. Acute, rapidly progressive renal failure with simultaneous use of amphotericin B and pentamidine. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(3):470-472.

Florey K. *Analitical Profiles of Drug Substances*. Vol. 6. New York and London: Academic Press London; 1977.

Atkinson AJ, Bennett JE. Amphotericin B pharmacokinetics in humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 1978;13(2):271-76.

Babu RJ, Kanikkannan N, Kikwai L, Ortega C, Andega S, Ball K, *et al*. The influence of various methods of cold storage of skin on the permeation of melatonin and nimesulide. *J Control Release*. 2003;86:49-57.

Balfour JA, Faulds DT. A review of its pharmacodynamic and pharmacological properties, and therapeutic potential in superficial mycoses. *Drugs*. 1992;43:259-84.

Barberán J, Mensa C, Fariñas P, Llinares R, Serrano R, Menéndez C, y col. Recomendaciones de tratamiento antifúngico en pacientes con bajo grado de inmunodepresión. *Rev Esp Quimioter*. 2008;21(2):127-142.

Bardsley WG. *The Simfit Reference Manual* b. Disponible en: <http://www.simfit.man.ac.uk>.

Barry BW. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54:31–40.

Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2001;14:101–114.

Barnett JA, Payme RW, Yarrow D. *Yeast: Characteritics and Identification*. 3^a ed. Londres: Cambridge University Press; 2000.

Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and funtion of epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol.* 2012;30:257–62.

Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful trasdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2001;14:101-14.

Barwicz J, Gruszecki W, Gruda I. Sponteneous organization of amphotericin B in aqueous medium. *J Colloid Interface Sci.* 1993;158:71-76.

Barwicz J, Tancrede P. The effect of aggregation state of amphotericin-B on its interactions with cholesterol- or ergosterol-containing phosphatidylcholine monolayers. *Chem Phys Lipids.* 1997;85:145-155.

Beggs WH. Mechanisms of synergistic interactions between amphotericin B and flucytosine. *J Antimicrob Chemother.* 1986;17:402.

Benghezal M, Adam E, Lucas A, Burn C, Orchard MG, Deuschel C, *et al.* Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. *Cell Microbiol.* 2007;9:1336-1342.

Bennett J. Antimicrobial agents: Antifungal agents. In: Hardman J, Limbird L, editors. *The Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill; 1975. p.1175-1790.

Bickers DR. Antifungal therapy: potential interactions with other classes of drugs. *J Am Acad Dermatol.* 1994;3(Pt 2):S87-90.

Böttcher B, Palige K, Jacobsen ID, Hube B, Brunke S. Csr1/Zap1 Maintains Zinc Homeostasis and Influences Virulence in *Candida dubliniensis* but Is Not Coupled to Morphogenesis. *Eukaryot Cell.* 2015;14(7):661-670.

Brain KR, Walters KA, Watkinson AC. Investigation of skin permeation en vitro. In: Roberts MS, Walters KA, editors. *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. New York: Marcel Dekker, Inc; 1998. p.161-187.

Brajtburg J, Bolard J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clin microbiol rev*. 1996;9:512-31.

Brajtburg J, Elberg S, Kobayashi GS, Bolard J. Amphotericin B incorporated into egg lecithin-bile salt mixed micelles: Molecular and cellular aspects relevant to therapeutic efficacy in experimental mycoses. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38:300-6.

Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34:183-8.

Brennan B, Leyden JJ. Overview of topical therapy for common superficial fungal infections and the role of new topical agents. *J Am Acad Dermatol*. 1997;36(Supl 1):3-8.

Brime B. Desarrollo y caracterización farmacotécnica y farmacológica de nuevas formulaciones parenterales de anfotericina B [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2002.

Brobyn RD. The human toxicology of dimethyl sulfoxide. *Ann N Y Acad Sci*. 1975;243:497-506.

Bronaugh RL. Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques. In: Bronaugh RL, Maibach HI, editors. *Percutaneous Absorption, Mechanisms-Methodology, Drug delivery*. New York: Marcel Dekker, Inc; 1989. p.239-258.

Bronaugh RL, Hood HL, Kraeling MEK, Yourick JJ. Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques. In: Bronaugh RL, Maibach HI, editors. *Percutaneous Absorption, Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*. New York: Marcel Dekker, Inc.;1999. p. 229-33.

Bronaugh RL, Stewart RF. Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell. *J Pharm Sci*. 1985;74(1):64-67.

Bronaugh RL, Stewart RF, Simon M. Methods for in vitro percutaneous absorption studies VII: use of excised human skin. *J Pharm Sci.* 1986;75(11):1094-7.

Bolard J, Legrand P, Heitz F, Cybulska B. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry.* 1991;30:5707-15.

Bond GR, Curry SC, Dahl DW. Dimethylsulphoxide-induced encephalopathy [letter]. *Lancet.* 1989;1(8647):1134-5.

Bond JR, Barry BW. Hairless Mouse Skin is Limited as a Model for Assessing the effects of Penetration Enhancers in Human Skin. *J Invest Dermatol.* 1988;90:810-813.

Bouza E, Rubio MC. Antimicrobianos y criterios de uso racional: módulo 2: antifúngicos. España: Doyma; 2001.

Budtz-Jorgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiological study of yeast in elderly denture wearers. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1975;3:115-9.

Buenestado C, Suñé JM. Extensibilidad y Granulometría de Pomadas- Suspensión. 3. Extensibilidad: Resultados Experimentales. *Galén Acta.* 1972;25:193.

Buenestado C, Suñé JM. Extensibilidad y Granulometría de Pomadas- Suspensión. 3. Extensibilidad. *Galén Acta.* 1973;26:43.

Buenestado C, Suñé JM. Extensibilidad y Granulometría de Pomadas- Suspensión. 3. Extensibilidad. *Galén Acta.* 1973b;26:67.

Campanha AM, Tasca RS, Svidzinski TIE. Dermatomicoses: frequência diagnóstico laboratorial e adesão de pacientes ao tratamento em um sistema público de saúde, Maringá-PR, Brasil. *Lat. Am. J. Pharm.* 2007;26:442–448.

Carrillo-Muñoz AJ, Pemán J, Gobernado M. Nuevos antifúngicos. Presente y futuro. *Rev Esp Quimioter.* 1999;12:181-92.

Carrillo-Muñoz AJ, Tur-Tur C, Hernández-Molina JM, Quindós G, Giusiano G. El largo camino hacia el antifungico ideal. Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC). 2009;volumen:1–10 . <http://www.conicet.gov.ar/>

6. BIBLIOGRAFÍA

Carr PL, Felsenstein D, Friedman RH. Evaluation and management of vaginitis. *J Gen Intern Med*. 1998;13:335-46.

Cartwright RY. Use of antibiotics. Antifungals. *Br Med J*. 1978;2(6130):108-11.

Casas G. *Micología General*. Caracas: Universidad Central de Venezuela; 1989.

Castro I, Echarri E, Ferriols F, García A, Martínez J, Oliveras M y col. *Medicamentos Citostáticos*. 1ª ed. España: Sociedad Española de Farmacéuticos Hospitalaria; 2006 [consultado 5 de septiembre de 2015]. Disponible en: <http://www.sefh.es/libro/Wyeth/pdf/libro.pdf>

Catalán J, Diaz C, García-Blanco F. Characterization of binary solvent mixtures of DMSO with water and cosolvents. *J Org Chem*. 2001;66(17):5846-52.

Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar R. Cyclodextrins in Drug Delivery: and Updated Review. *AAPS PharmSciTech*. 2005;6(2):329-57.

Chattopadhyay A, Jafurulla M. A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;416:7-12.

Christiansen KJ, Bernard EM, Gold JW, Armstrong DA. Distribution and activity of amphotericin B in humans. *J Infect Dis*. 1985;152:1037-43.

Coceani N, Colombo I, Grassi M. Acyclovir permeation through rat skin: mathematical modelling and in vitro experiments. *Int J Pharm*. 2003;254:197-210.

Cona T. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectología*. 2002. 19: 77-81.

Conant NF, Martin DS, Smith DT, Baker RD, Calloway JL. *Manual of clinical mycology*. 2ª ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1944.

Conejo-Mir L, Narváez B, Conejo-Mir J. La capa córnea: mucho más que una barrera inerte. Implicaciones en los tratamientos cosméticos. *Piel [Internet]*. 2011 [citado 17 de abril del 2015];26:412-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.piel.2011.03.009>.

Córdoba-Díaz M, Nova M, Elorza B, Córdoba-Díaz D, Chantres, JR, Córdoba-Borrego M. Validation protocol of an automated in-line flow-through diffusion equipment for in vitro permeation studies. *J Control Rel.* 2000;69:357-367.

Córdoba M, del Río LA. Memoria [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1990.

Craven PC, Ludden TM, Drutz DJ, Rogers W, Haegle KA, Skrdlant HB. Excretion pathways of amphotericin B. *J Infect Dis.* 1979;140(3):329-341.

Crespo V, Delgado V. Micosis Cutáneas. *Med Clin (Barc).* 2005;125(12):467-474.

Crespo V, Florencio VD. Malassezia species in skin diseases. *Curr Opin Infect Dis.* 2002;15:133-42.

Crespo V, Martínez S. Historia de las micosis cutáneas. *Piel [Internet]*. 2004 [citado el 6 de marzo del 2015];19(7):352-358. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-9251\(04\)72869-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-9251(04)72869-5).

Crespo V. Micosis superficiales: definición y clasificación. *Med Clin (Barc).* 2006;126(Supl 1):3-6.

Crespo V, Ojeda A, Vera A, Crespo A, Sánchez F. Malassezia globosa as the causative agent of pityriasis versicolor. *Br J Dermatol.* 2001;143:799-803.

Creus N. Toxicity to topical dimethyl sulfoxide (DMSO) when used as an extravasation antidote. *Pharm World Sci.* 2002;24(5):175– 176.

Darole PS, Hegde DD, Nair HA. Formulation and evaluation of microemulsion based delivery system for amphotericin B. *AAPS PharmSciTech [Internet]*. 2008 [cited 2015, Jan 8];9:122-128. DOI: [10.1208/s12249-007-9022-8](https://doi.org/10.1208/s12249-007-9022-8).

Das S, Goyal R, Bhattacharya SN. Laboratory-based epidemiological study of superficial fungal infections. *J Dermatol.* 2007;34(4):248-53.

Dawson TE, Jamison J. Intravesical treatments for painful bladder syndrome/ interstitial cystitis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2007, Issue 4. Art. No.: CD006113. DOI: 10.1002/14651858.CD006113.pub2

De Bernardis F, Mondello F, San Millán R, Pontón J, Cassone A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 1999;37:3481-6.

De Bernardis F, Tacconelli E, Mondello F, Cataldo A, Arancia S, Cauda R, *et al.* Antiretroviral therapy with protease inhibitors decreases virulence enzyme expression in vivo by *Candida albicans* without selection of avirulent fungus strains or decreasing their anti-mycotic susceptibility. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2004;41:27-34.

De la Calle-Rodríguez N, Santa-Vélez C, Cardona-Castro N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. Rev CES Med [Internet]. 2012 [citado el 1 de febrero del 2015];26(1):43-55. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v26n1/v26n1a05.pdf>

Dalmau J, Peramiquel L, Roé E, Puig L. Micosis superficiales (y II). Farmacia Profesional. 2005, 19:4. 60-63.

De Paw BE, Picazo JJ. Present situation en the treatment of invasive fangal infection. Int. J. Antimicrob. Agents. 2008;32:167-71.

Delgado V, Crespo V. Aspectos clínicos de las candidiasis cutaneomucosas. Monogr Dermatol. 1994;7:104-15.

Delgado V, Crespo V. Micosis cutáneas. Medicine (ed esp). 2002;8:4805-15.

Deray G. “Amphotericin B nefrotoxicity”. J Antimicrob Chemother. 2002;49(Supl. 1):37-41.

Diezmann S, Dietrich FS. *Saccharomyces cerevisiae*: Population divergence and resistance to oxidative stress in clinical, domesticated and wild isolates. PLoS One [Internet]. 2009 [cited 2014, dec 10];4:1–11. DOI: [10.1371/journal.pone.0005317](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005317).

Donovick R, Gold W, Pagano JF, Stout HA. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiot ann.* 1955;3:579-586.

Dreizen S. Oral candidiasis. *Am J Med.* 1984;30:28-33.

Duchene D, Vaution C, Glamot F. Cyclodextrin, their value in pharmaceutical Technology [Internet]. Ellis Horwood Ltd; 1989 [cited 2015, march 6]. DOI: [10.3109/03639048609042630](https://doi.org/10.3109/03639048609042630).

Duma RJ, Finley R. In vitro susceptibility of pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* species to a variety of therapeutic agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976;10:370-6.

Durrheim H, Flynn GL, Higuchi WI, Behl CR. Permeation of hairless mouse skin I: experimental methods and comparisons with human epidermal permeation by alkanols. *J Pharm Sci.* 1980;69(7):781-786.

Egito LC, Medeiros SR, MG Medeiros, Price JC, Egito ES. Evaluation of the relationship of the molecular aggregation state of amphotericin B in medium to its genotoxic potential. *J Pharm Sci.* 2004;93:1557-65.

Elewski BE. Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:415-29.

Ellepola AN, Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(2):172-98.

Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(Supl 1):7-10.

El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci.* 2008;34:203-222.

Elorza B, Elorza MA. Formas de administración cutánea. En: Lozano MC, Córdoba M, Córdoba D. *Manual de tecnología farmacéutica + StudentConsult en español*. Barcelona: Elsevier Science & Technology; 2012. p. 411-24.

Ely A, Lockwood B. What is the evidence for the safety and efficiency of dimethyl sulfoxide and methylsulfonylmethane in pain relief?. *Pharm J*. 2002;269:685–687.

Enache-Angoulvant A, Hennequin C. Invasive *Saccharomyces* infection: A comprehensive review. *Clin Infect Dis*. 2005;41:1559–68.

English JC, Laws RA, Keough GC, Wilde JL, Foley JP, Elston DM. Dermatoses of the glans penis and prepuce. *J Am Acad Dermatol*. 1997;37:124.

Ernst C, Grange J, Rinnert H, Dupont G, Lematre J. Structure of amphotericin B aggregates as revealed by UV and CD spectroscopies. *Biopolymers*. 1981;20:1575-88.

Espada R. Estudio farmacéutico de distintos estados de agregación de anfotericina B [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2008.

Espada R, Valdespina S, Alfonso C, Rivas G, Ballesteros MP, Torrado JJ. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int J Pharm*. 2008;361:64-69.

Espada R, Josa JM, Valdespina S, Dea MA, Ballesteros MP, Alunda JM, Torrado JJ. HPLC assay for determination of amphotericin B in biological samples, *Biomedical chromatography : BMC*. 2008b;22:402-407.

Espada R, Valdespina S, Dea MA, Molero G, Ballesteros MP, Bolás F, *et al*. In vivo distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation. *J Antimicrob Chemother*. 2008c;61(5):1125-31.

Espinel-Ingroff A, Canton E. Comparison of Neo-Sensitabs® tablet diffusion assay with CLSI broth microdilution M38-A and disk diffusion methods for testing susceptibility of filamentous fungi with amphotericin B, caspofungin itraconazole, posaconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol*. 2008;46(5):1793-803.

Estrada GA, Márquez M, González E, Díaz JM, Agüero LA. Manifestaciones bucales de la candidiasis en pacientes con trasplante renal. *MEDISAN* [Internet]. 2015[citado 2 de septiembre de 2015];19(6):722-729. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192015000600003&lng=es.

- Evans EG, James IG, Seaman RA, Richardson MD. Does naftifine have anti-inflammatory properties? A double-blind comparative study with 1 % clotrimazole/1 % hydrocortisone in clinically diagnosed fungal infection of the skin. *Br J Dermatol*. 1993;129:437-42.
- Faix RG. Invasive neonatal candidiasis: comparison of albicans and parasilopsis infection. *Pediatr Infect Dis J*. 1992;11:88-93.
- Faulí C, Trillo I. Tratado de Farmacia Galénica. Madrid: Luzan 5-S.A. de ediciones; 1993.
- Fawcett DW, Jensch RPJ, Bloom W. Bloom & Fawcett's concise histology. London: Arnold; 2002.
- Fernández R, González ME, Fernández J, Cepeda FJ. Fármacos antifúngicos. Situación actual y pautas para su administración. *Clin Transl Oncol*. 2005;7(9):377-88.
- Ferrándiz C, Bielsa I, Ferrándiz L. Micosis cutáneas en la edad pediátrica. *Med Clin (Barc)*. 2006;126(Supl 1):37-42.
- Ferrer J. Vaginal candidosis: Epidemiological and etiological factors. *Int J Gynecol Obstet*. 2000;71(Supl 1):21-7.
- Fidel PL. History and update on host defense against vaginal candidiasis. *Am J Reprod Immunol*. 2006;57:2-12.
- Fidel PL, Vázquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12:80-96.
- Fischer JM. DMSO: a review. *US Pharm*. 1981;6:25-28.
- Fong IW. The rectal carriage of yeast in patients with vaginal candidiasis. *Clin Invest Med*. 1994;17:426-31.
- Font E, Freixes J, Julve J. Perfil del nuevo antimicótico tópico eberconazol. *Rev Iberoam Micol*. 1995;12:16-27.

Forouzanfar T, Koke A, van Kleef M, Weber W. The treatment of complex regional pain syndrome type 1. *Eur J Pain*. 2002;6:105-22.

Foster KW, Mahmoud A, Ghannoum MA. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. *J. Am. Acad. Dermatol*. 2004;50:748-52.

Fowler JE. Prospective study intravesical dimetil sulfoxide in treatment of suspected early interstitial cystitis. *Urology*. 1981;18:21-26.

Francis-Morrill J, Heinig MJ, Pappagianis D, Dewey KG. Diagnostic value of signs and symptoms of mammary candidiasis among lactating women. *J Hum Lact*. 2004;20:288-95.

Franz TJ. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol*. 1975;64:190-5.

Frömming KH, Szejtli J. Cyclodextrins in Pharmacy. Topics in inclusion science. Vol 5. Netherlands: springer-science+business media, b.v; 1994.

Gaboriau F, Cheron M, Leroy L, Bolard J. Physicochemical properties of the heat-induced superaggregates of amphotericin B. *Biophys Chem*. 1997;66:1–12.

Galayo G. Formulaciones tópicas antivirales para el tratamiento de herpes cutáneo: utilización de modernos promotores de absorción [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2006.

García-Martos P, Domínguez I, Maín P, García-Agudo R, Aoufi S, Mira, J. Sensibilidad a antifúngicos de levaduras patógenas emergentes. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. 2001;19:249-256.

Gaspar M, Bovaira M, Carrera-Hueso FJ, Querol M, Jiménez A, Moreno L. Efectividad de un protocolo de tratamiento tópico con dimetilsulfóxido al 50 % en el síndrome de dolor regional complejo tipo 1. *Farm Hosp*. 2012;36(5):385-391.

Gennaro AR. Remington Farmacia. Tomo 2. 20ª Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003.

Ghannoum MA, Burn GR, Elteen K. Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida* spp. to human buccal epithelial cells. *Infect Immun*. 1986;54:189-193.

Gimeno-Carpio E. Tratamiento tópico de las micosis cutáneas superficiales. *Med Clin (Barc)*. 2006;126(Supl 1):43-6.

Giraldo P, Von Nowaskonski A, Gomes FA, Lindares I, Neves NA, Witkin SS. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol*. 2000;95:413-6.

Ginarte M, Paredes C. Empleo de antiinfecciosos en patología cutánea. Tratamiento sistémico y tópico. Contraindicaciones. Criterios de respuesta. Efectos secundarios. *Medicine (ed esp)*. 2002;8:4768-73.

González D, Pereiro MJ. Candidiasis mucocutáneas. *Piel [Internet]*. 2008 [citado el 6 de marzo del 2015];23(8):460-70. DOI: 10.1016/S0213-9251(08)74944-X.

Goodman L, Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ª ed. México: Mc Graw hill Interamericano; 1996.

Gruby D. Mémoire sur une végétation qui constitue la vraie teigne. *C R Acad Sci*. 1841b;13:72-5.

Gruby D. Recherches sur la nature, le siège et le développement du porrigo decalvans ou phytoalopécie. *C R Acad Sci*. 1843;19:301-3.

Gruby D. Recherches sur les cryptogames qui constituent la maladie contagieuse du cuir chevelu décrite sous le nom de teigne tondante (Mahon) herpes tonsurans (Cazénave). *C R Acad Sci*. 1844;18:583-5.

Gruby D. Sur les mycodermes qui constituent la teigne faveuse. *C R Acad Sci*. 1841b;13:309-12.

Gruby D. Sur une espèce de mentagre contagieuse résultante du développement d'un nouveau cryptogame dans la racine des poils de la barbe de l'homme. *C R Acad Sci*. 1842;15:512-3.

Gruszecki WI, Luchowski R, Wasko P, Gryczynski Z, Gryczynski I. Molecular organization of polyene antibiotic amphotericin B studied by means of fluorescent technique. *Methods Mol Biol.* 2012;875:57-65.

Güngör S, Erdal MS, Aksu B. New formulation strategies in topical antifungal therapy. *J Cosm Dermatol Sci Appl.* 2013;3:56-65.

Gupta AK. Systemic antifungal agents. In: Wolverton SE, editor. *Comprehensive dermatologic drug therapy*. Philadelphia: WB Saunders Company; 2001. p.55-84.

Gutiérrez R. Estudios de difusión a través de piel de formulaciones liposómicas de Aciclovir [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2011.

Guy RH, Hadgraft J. Mathematical models of percutaneous absorption, In: Bronaugh RL, Msibach HI, editors. *Percutaneous Absorption, Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1999. p 229-233.

Hadgraft J. Skin, the final frontier. *Int J Pharm.* 2001;224:1-18.

Hadgraft J, Wolff HM. In vitro/in vivo correlations in transdermal drug delivery, In: Roberts MS, Walters KA, editors. *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. New York: Marcel Dekker, Inc.;1998. p. 161-87.

Haido RM, Barreto-Bergter E. Amphotericin B-induced damage of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Chem Biol Interact.* 1989;71:91-103.

Harada A. Design and construction of supramolecular architectures consisting of cyclodextrins and polymers. *Adv Polym Sci.* 1997;133:141-91.

Harding CR. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther.* 2004;17:6-15.

Harrison DJ., Knutson K. Accurate determination of skin flux from flow-through diffusion cell data. *Pharm Res.* 1995;12(12):2003-11.

Hatabu T, Takada T, Taguchi N, Suzuki M, Sato K, Kano S. Potent plasmodicidal activity of a heat-induced reformulation of deoxycholate-amphotericin B (Fungizone) against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:493-6.

Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008;51(Supl 4):2–15.

Hay RJ. Antifungal drugs in dermatology. *Semin Dermatol*. 1990;4:309-17.

Hay RJ, Moore MK. Micology. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's textbook of dermatology*. Oxford: Blackwell Science; 2004. p. 1-31.

Hay RJ. Yeast infections. *Dermatol Clin*. 1996;14:113-24.

Hernández A, Rodríguez-Moldes B. Casos clínicos en Dermatología pediátrica, ¿cuál es tu diagnóstico? En: AEPap, ed. *Curso de Actualización Pediatría 2014*. Madrid: Exlibris Ediciones; 2014. p.223-4.

Hernández-Solís SE, Rueda-Gordilloa F, Rojas-Herrera RA. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. *Rev Iberoam Micol*. 2014;31(2):137–140.

Higgins J. A comparative investigation of glycinebetaine and dimethylsulphoxide as liposome cryoprotectants. *J Pharm Pharmacol*. 1987;39:577–582.

Higgs JM, Wells RS. Classification of chronic mucocutaneous candidiasis with observations on the clinical picture and its therapy. *Hautarzt*. 1974;25:159-65.

Holland J, Young ML, Lee O, Chen CA. Vulvovaginal carriage of yeasts other than *Candida albicans*. *Sex Transm Infect*. 2003;79:249-50.

Hsuchen CC, Feingold DS. Selective membrane toxicity of the polyene antibiotics: studies on lecithin membrane models (liposomes). *Antimicrob Agents Chemother*. 1973;4:309-15.

Huanca NI, Surco VJ. Antimicóticos. *Rev Act Clin Med [Internet]*. 2012 [citado 1 de septiembre de 2015];25: 1292-6. Disponible en:

http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682012001000010&lng=es

Huang W, Zhang Z, Han X, Tang J, Wang J, Dong, *et al.* Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophys J.* 2002;83:3245-55.

Hughes CE, Harris C, Moody JA. In vitro activities of amphotericin B in combination with four antifungal agents and rifampin against *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984;25:560.

Hughes CE, Harris C, Peterson LR, Gerding DN. Enhancement of the in vitro activity of amphotericin B against *Aspergillus* spp by tetracycline analogs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984;26:840.

Hutchaleelaha A, Chow H, Mayersohn M. Comparative pharmacokinetics and interspecies scaling of amphotericin B in several mammalian species. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49:178-83.

Jacob SW, editor. Dimethyl Sulfoxide. Vol. 1. New York: Marcel Dekker; 1971.

Jacob SW, Jack C. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) in Trauma and Disease. United States: CRC Press;2015.

Janoff AS, Boni LT, Popescu MC, Minchet SR, Cullis PR, Mallen TD, *et al.* Unusual lipid structures selectivity reduce the toxicity of amphotericin B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:6122–6.

Jiang M, Qureshi S, Midha K, Skelly J. In vitro evaluation of percutaneous absorption of an Acyclovir product using intact and tape-stripped human skin. *J Pharm Pharm Sci* [Internet]. 1988 [cited 2015, February, 5];1(3):102-107. Available from: www.ualberta.ca/~csps.

Junquera E. Complejos de inclusión de ciclodextrinas en medios micelares [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1992.

- Kajta'r M, Vikmon M, Morlin E, Szejtli J. Aggregation of amphotericin B in the presence of γ -cyclodextrin. *Biopolymers*. 1989;28:1585–86.
- Kent HL. Epidemiology of vaginitis. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165:1168-76.
- Kirkpatrick CH. Chronic mucocutaneous candidiasis. *J Am Acad Dermatol*. 1994;31:S14-7.
- Kinsky SC. Antibiotic interaction with model membranes. *Annu Rev Pharmacol*. 1970;10:119-42.
- Klenk A, Martin A, Heffernan M. Infecciones por levaduras: candidiasis, pitiriasis (tiña) versicolor. En: Freedberg I, Eisen A, Wolff K, Austen F, Goldsmith L, Katz S, editores. *Dermatología en medicina general: Tomo III*. 6a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005. p.2269-82.
- Knott LJ. Safety of intravenous dimethylsulphoxide [letter]. *Lancet*. 1980;13(8207):1299.
- Knudsen L, Ciminera J. Estadística. En: Gennaro AR. *Remington Farmacia*. Tomo 2. 20ª Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003. p.148-160.
- Kremery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect*. 2002;50:243-60.
- Lambing HE, Wolf BD, Hartsel SC. Temperature effects on the aggregation state and activity of amphotericin B. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1152:185–8.
- Laurence HJ, Goodnight SH. Dimethyl sulfoxide and extravasation of anthracycline agents. *Ann Intern Med*. 1983;91:1025.
- Lavasanifar A, Samuel J, Sattari S, Kwon, GS. Block copolymer micelles for the encapsulation and delivery of amphotericin B. *Pharm Res*. 2002;19:418-422.
- Legrand P, Romero EA, Cohen BE, Bolard J. Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:2518-22.

Lemke A, Kiderlen AF, Kayser O. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;68:151-162.

Leshner J, McConell C. Antimicrobial Drugs. En: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. St Louis: Mosby; 2003. p.2007-53.

Lim CS-Y, Rosli R, Seow HF, Chong PP. Candida and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(1):21–31.

Llanos R, Fernández-Espinar MT, Querol A. A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006;90:221–31.

López D, Rodríguez D, Morales A, Soriano A. Aproximación al manejo de la patología micótica en el pie. *Rev Int Cienc Podol*. 2015;9(1):24-36.

López-Martínez R. Candidosis, a new Challenger.MD. *Clin Dermatol*. 2010;28:178–184.

Lundstrom A, Serre G, Haftek M, Egelrud T. Evidence for a role of corneodesmosin, a protein which may serve to modify desmosomes during cornification, in stratum corneum cell cohesion and desquamation. *Arch Dermatol Res*. 1994;289:369-75.

MacGregor WS. The chemical and physical properties of DMSO. *Ann NY Acad Sci*. 1967;141:3–12.

Madison KC. Barrier function of the skin: «la raison d'être» of the epidermis. *J Invest Dermatol*. 2003;121:231-41.

Maestre JR, Alou L. Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. *Rev Esp Quimioter*. 2001;14(3):17-21.

Magliani W, Conti S, Cassone A, De Bernardis F, Polonelli L. New immunotherapeutic strategies to control vaginal Candidiasis. *Trends Mol Med*. 2002;8:121-5.

Malewicz B, Momsen M, Jenkin HM. Combined effect of aciclovir and amphotericin B on the replication of Pseudoarabies virus in BHK-21 cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983;23:119.

Manzano P, Méndez L, Hernández F, López R. La resistencia a los antifúngicos: Un problema emergente en México. *Gac Méd Mex.* 2008;144(1):23-26.

Martin AG, Kobayashi GS. Yeats infections: candidiasis, pityriasis (tinea) versicolor. En: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolf K, Freedberg IM, Frank Austin K, editors. *Dermatology in general medicine.* 4th ed. New York: McGraw-Hill; 1993. p.2452-67.

Sweetman S. Martindale. *Guía Completa de Consulta Fármaco-Terapéutica.* 1ª Ed. España: Pharma Editores; 2003.

Martínez G, Gómez MA. Ciclodextrinas: Complejos de inclusión con polímeros. *Rev Iberoam Polím.* 2007;8(4):300-12.

Martínez JA, Losa JE, Mensa J. Infecciones fúngicas en la asistencia primaria. *Med. Integral.* 1997;29:36-54.

Martín MT, Crespo V, Samaniego E, Gómez E. Distribución de las especies de *Malassezia* en pacientes con pitiriasis versicolor y en individuos sanos. *Piel.* 2010; 25(10):552–60.

Mathaba LT, Davies G, Warmington JR. The genotypic relationship of *C. albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. *J Med Microbiol.* 1995;42:372-9.

Maryadele JO . *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.* 13ª Ed. New Jersey: Index Merck Inc.; 2001.

McAleer MA, Irvine AD. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:280-91.

McCormack WMJ, Zinder SH, Mc Cormack WM. The incidente of genitourinary infections in a cohort of healthy women. *Sex Transm Dis.* 1994;21:63-4.

McGarvey GJ, Mathys JA, Wilson KJ. Synthesis of amphotericin B: a convergent strategy to the polyol segment of the heptaene macrolide antibiotics. *J Org Chem.* 1996;61:5704-5.

Méndez-Tova LJ, Cumplido-Urbe C, Hernández-Hernández F, Ramos-Hernández J, López-Martínez R. Micosis invasivas en pacientes inmunodeprimidos con fiebre de origen desconocido. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2012;50(6):609-14.

Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:142–51.

Micheli PA. *Nova plantarum genera juxta tournefortum methodum disposita.* Florencia: Bernardo Paperini; 1729.

Miles MR, Olsen L, Rogers A. Recurrent vaginal candidiasis. Importance of an intestinal reservoir. *JAMA.* 1977;238:1836-7.

Milhaud J, Ponsinet V, Takashi M, Michaels B. Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insights into the role of ergosterol. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1558:95-108.

Moffat A, Jackson V, Moss M, Widdop B. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Post-Mortem Material.* 2^a ed. London: The Pharmaceutical Press; 1986. pp. 1223.

Mohamed R. New active natural phytochemicals for the treatment and prevention of infectious diarrhea. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2015.

Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur J Pharm Biopharm.* 2001;52:103-112.

Mottu F. Organic solvents for pharmaceutical parenterals and emulsion liquids: a review of toxicity data. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2000;54(6):456–469.

- Munoz P, Bouza E, Cuenca-Estrella M, Eiros JM, Pérez MJ, Sánchez-Somolinos M. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: An emerging infectious disease. *Clin Infect Dis*. 2005;40:1625–34.
- Murdoch LA. Dimethyl sulfoxide (DMSO): an overview. *Can J Hosp Pharm*. 1982;35(3):79–85.
- Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología Médica*. 5ª Ed. España: Elsevier; 2006.
- Muthu KK, Amol BS, Aparna SC, Prashik BD, Rahul PW, Maheshwar SM, *et al*. The biology and chemistry of antifungals agents: A review. *Bioorg Med Chem*. 2012;20:5678-98.
- Namaka M, Briggs C. DMSO revisited. *Can Pharm J*. 1994;127:248-255.
- Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med*. 1999;31:5-19.
- Nicolaou k, Daines R, Chakraborty T, Ogawa Y. Total synthesis of amphotericin B. *J Am Chem Soc*. 1987;109:2821-2822.
- Nolte W. *Microbiología Odontológica*. 4ª ed. México: Interamericana; 1986.
- Nyirjesy P. Chronic vulvovaginal candidiasis. *Am Fam Physician*. 2001;63:697-702.
- Nyirjesy P, Seeney SM, Grody MH, Jordan CA, Buckley HR. Chronic fungal vaginitis: the value of cultures. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173:820-3.
- Oliveira AC, Silva RS. Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: Uma revisão. *Rev Eletrônica Enferm [Internet]*. 2008 [cited 2015, march 30];10:189-197. Available from: <http://www.fen.ufg.br/revista/v10/n1/v10n1a17.htm>
- Palacios DS, Dailey I, Siebert DM, Wilcock BC, Burke MD. Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 2011;108:6733-8.

Pappas PJ, Kauffman CA. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis. 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009;48:503-35.

Pardi G, Cardozo EI. Algunas consideraciones sobre Candida albicans como agente etiológico de candidiasis bucal. Acta Odontol Venez. 2002;40(1):1-15.

Pariser DM. Cutaneous candidiasis. A practical guide for primary care physicians. Postgrad Med. 1990;87:101-8.

Parker WA, Bailie GR. Current therapeutic status of DMSO. Can Pharm J. 1982;115:247-251.

Parry GE, Bunge AL, Silcox GD, Pershing LK, Pershing DW. Percutaneous absorption of benzoic acid across human skin. I. In vitro experiments and mathematical modelling. Pharm Res. 1990;7(3):230-236.

Pedraz J, Delgado-Jiménez Y, Pérez-Gala S, Nam-Cha S, Fernández-Herrera J, García A. Cutaneous expression of systemic candidiasis. Clin. Exp. Dermatol. 2008;32:s93-7.

Pereira G, Yargo M, Casimiro DT, Bezerra FJ, Converti A, Pessoa A, *et al.* Antifungal activity of topical microemulsion containing a thiophene derivative. Braz J Microbiol. 2014;45(2):545-550.

Pereiro M, García-Martínez FJ, Alonso-González J. Actualización en el tratamiento de las micosis cutáneas. Actas Dermosifiliogr. 2012;103(9):778-83.

Pereiro M, Gómez-Bernal S, Rodríguez-Pazos L, Toribio J. Micosis más frecuentes en inmunodeprimidos. Piel [Internet]. 2010 [citado el 6 de marzo del 2015];25(2):91-99. DOI: [10.1016/j.piel.2009.09.007](https://doi.org/10.1016/j.piel.2009.09.007)

Perez RS, Zuurmond WW, Bezemer PD, Kuik DJ, van Loenen AC, de Lange JJ, *et al.* The treatment of complex regional pain syndrome type I with free radical scavengers: a randomized controlled study. Pain. 2003;102:297-307.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007;20(1):133-163.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Fluit AC, Verhoef J, Sader HS. Blood stream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance in North America and Latin America. 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:747-51.

Phillips RM, Rosen T. Topical antifungal agents. En: Wolverton SE, editor. *Comprehensive dermatologic drug therapy*. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 2001. p.497-523.

Pierce AM, Pierce HD, Unrau AM, Oelschlager AC. Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans*. *Can J Biochem.* 1978;56:135-142.

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: An indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008;17:1063-72.

Qadripur SA. Antimycotic therapy 2. Antimycotic chemotherapeutic agents: imidazole derivatives, tolclate, haloprogin, ciclopiroxolamin. *Fortschr Med.* 1983;101:355-63.

Rain AN, Radzan T, Sajiri S, Mak JW. In vitro drug susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to chloroquine, ivermectin and fungizone. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1996;27:319-24.

Randhawa MA. Dimethyl sulfoxide (DMSO) inhibits the germination of *Candida albicans* and the arthrospores of *Trichophyton mentagrophytes*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2008;49(2):125-8.

Rawlings AV. Trends in stratum corneum research and the management of dry skin conditions. *Int J Cosmet Sci.* 2003;25:63-95.

Real Farmacopea Española (RFE) [Base de datos de Internet]. 5ª ed. Madrid: Editorial: Boletín Oficial del Estado (BOE). [actualizada el 15 enero de 2015; acceso el 27 de abril de 2015]. Disponible en: <https://extranet.boe.es/farmacopea/doc>.

Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:5–24.

6. BIBLIOGRAFÍA

Ringdahl EN. Treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am Fam Physician*. 2000;61:331-7.

Rippon JW. *Medical mycology*. 3^a ed. Philadelphia: WB Saunders; 1988.

Ritcher SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiologic of recurrent cases. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2155-62.

Roderick J, Hay DM. The management of superficial candidiasis. *J Am Acad Dermatol*. 1999;40:S35-42.

Rodríguez IC. Ciclodextrinas. Faulí -Trillo C. *Tratado de Farmacia Galénica*. Madrid: Luzan, S.A.; 1993. p. 211-218.

Rodríguez-Pichardo A, García-Bravo B. Candidiasis cutaneomucosas. Manifestaciones clínicas. *Med Clin (Barc)*. 2006;126(Supl 1):20-24.

Rospond RM, Engel LM. Dimethyl sulfoxide for treating anthracycline extravasation. *Clin Pharm*. 1993;12:560-561.

Rotger R. *Microbiología Sanitaria y Clínica*. Madrid: Editorial Síntesis; 1997.

Rowen JL. Mucocutaneous candidiasis. *Semin Perinatol*. 2003;27:406-13.

Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6^a ed. USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; 2009.

Rubin AL, Bagheri B, Scher RK. Six nobel antimicrotics. *Am J Clin Dermatol*. 2002;3:71-81.

Ruckenstein E, Nagarajan R. Critical Micelle Concentration. A Transition Point for Micellar Size Distribution. *J Phys Chem*. 1975;79:2622-6.

Rueda R. Micosis superficiales y dermatomicosis. *Colomb Méd [Internet]*. 2002 [citado 25 de noviembre del 2015];33(1):10-16. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28333103>

Ruiz H. Desarrollo y caracterización de una formulación tópica de anfotericina B con gamma-ciclodextrina [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2010.

Ryan PG, Wallace DMA. Are we making progress in the drug treatment of disorders of the bladders, prostate, and penis?. *J Clin Pharm Ther.* 1990;15:1-12.

Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, *et al.* In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2009-15.

Saenger W. *Angew. Chem Int Ed Engl.* 1980;19:344.

Salonen JH, Richardson MD, Gallacher K, Issakainen J, Helenius H, Lehtonen OP. Fungal colonization of haematological patients receiving cytotoxic chemotherapy: Emergence of azole-resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Hosp Infect.* 2000;45:293–301.

Samson J. Candidiosis buccales: Epidémiologie, diagnostic et traitement. *Rev Mens Suisse Odontostomatol.* 1990;100:548-559.

Sánchez- Brunete JA. Microesferas con anfotericina B para el tratamiento de leishmaniosis visceral [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2003.

Sánchez-Brunete JA, Dea MA, Rama S, Bolás F, Alunda JM, Torrado S, *et al.* Amphotericin B molecular organization as an essential factor to improve activity/toxicity ratio in the treatment of visceral leishmaniasis. *J Drug Target.* 2004;12(7):453-460.

Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes MJS. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013;62:10-24.

Sanz FJ, García ME, Gonzalo I, Girón R. Dermatomicosis por *Candida krusei* simulando herpes cutáneo. *Rev Pediatr Aten Primaria.* 2015;17:e53-e56.

Schaefer H, Redelmeier TE. Structure and dynamics of the skin barrier. *Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption*, Karger, Basel. 1996;1:1-42.

Schaefer H, Redelmeier TE. Composition and structure of the stratum corneum. Schaefer H, Redelmeier TE. *Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption*, Karger, Basel. Paris: Karger. 1996b. p. 43-86.

Schardinger E. *Wien. Klin. Woohensohl*. 1904;17:207.

Scheinfeld NS. Obesity and dermatology. *Clin Dermatol*. 2004;22:303-9.

Schmid J, Rotman M, Reed B, Pierson CL, Soll DR. Genetic similarity of candida albicans strains from vaginitis patients and their partners. *J Clin Microbiol*. 1993;31:39-46.

Schmitt S. Parenterale O/W Emulsionen: Plasmaproteinineraktion und Interaktion von Arzneistoffen [PhD thesis]. Berlin: Freie Universitat Berlin; 2002.

Schwartz RA. Superficial fungal infections. *Lancet*. 2004;364(9440):1173–82.

Scott L, Scotti MT, Lima EO, Silva MS, Lima MCA, Pitta IR, *et al*. Experimental methodologies and evaluations of computer-aided drug design methodologies applied to a series of 2-aminothiophene derivatives with antifungal activities. *Molecules* [Internet]. 2012 [cited 2014, Nov 24];17:2298-315. DOI: [10.3390/molecules17032298](https://doi.org/10.3390/molecules17032298)

Segal J. Candida, still number one-what do we know and we are we going from there?. *Mycoses*. 2005;48(Supl 1):3-11.

Serrano DR. Nuevas formulaciones orales, tópicas y parenterales de anfotericina B con acción antifúngica y antiparasitaria [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2013.

Shao LC, Sheng CQ, Zhang WN. Recent advances in the study of anti fungal lead compounds with new chemical scaffolds. *Yaoxue Xuebao*. 2007;42:1129-1136.

Shepherd M. The pathogenesis and host defence mechanisms of oral candidiosis. *N Z Dent J*. 1986;82:78-82.

- Singh V, Sharma H, Veerma R, Javed A, Singh M. Topical non steroidal anti inflammatory drug (NSAIDs microemulsions: Rationale, review and future prospective. Asian J Pharm [Internet]. 2013[cited 2015, Sep 8];7:1-7. Available from: <http://www.asiapharmaceutics.info/text.asp?2013/7/1/1/110929>
- Skovgaard N. New trends in emerging pathogens. Int J Food Microbiol. 2007;120:217–24.
- Smith D, Metzgar D, Wills C, Fierer J. Fatal *Saccharomyces cerevisiae* aortic graft infection. J Clin Microbiol. 2002;40:2691–2.
- Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. Lancet. 2007;369:1961-71.
- Soler L, Caffrey P, McMahon H. Effects of new amphotericin analogues on the scrapie isoform of the prion protein. Biochim Biophys Acta. 2008;1780:1162-7.
- Spacek J, Buchta V. Itraconazole in the treatment of acute and recurrent vulvovaginal candidiasis: Comparison of a 1-day and a 3-day regimen. Mycoses. 2005;48:165-71.
- Spinillo A, Capuzzo E, Gulminetti R, Marone P, Colonna L, Piazzzi G. Prevalence of and risk factors for fungal vaginitis caused by non-albicans species. Am J Obstet Gynecol. 1997;176:138-41.
- Stiller MJ. Systemic drugs in the treatment of dermatophytoses. Int J Dermatol. 1993;32:16.
- Sud IJ, Feingold DS. Effect of ketoconazole on the fungicidal action of amphotericin B in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 1983;23(1):185-7.
- Suñe JM, Cerezo A. Reología en pomadas: I. Revisión de métodos para su estudio. Ars. Pharm. 1967;VIII:5-6.
- Swanson BN. Medical use of dimethyl sulphoxide (DMSO). Rev Clin Basic Pharm. 1985;5:1-33.
- Sykes LM, Coogan MM. Yeast counts as a measure of host resistance in dental patients. J Dent Assoc S Afr. 1997;52:19-23.

Szejtli J. Cyclodextrins and Their inclusion Complexes. Hungary: Akademiai Kiado; 1982.

Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. Chem Rev. 1998;98(5):1743-54.

Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. Chem Rev. 1998;98(5):1743-54.

Szejtli J, Osa T. Cyclodextrins. Comprehensive Supramolecular Chemistry. Vol 3. Oxford: Pergamon Press;1996.

Szejtli J. Past, present and future of cyclodextrins research. Pure Appl Chem. 2004;76(10):1825-45.

Szejtli J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. J Mater Chem. 1997;7(4):575-87.

Szepietowski JC, Baran E, Wild E. Tinea versicolor: a prospective study. Korean J Med Mycol. 2000;5:108-12.

Sznitowska M, Janicki S, Baczek A. Studies on the effect of pH on the lipoidal route of penetration across stratum corneum. J Control Release. 2001;76:327-35.

Takahashi K. Organic Reactions Mediated by Cyclodextrins. Chem Rev. 1998;98(5):2013-34.

Tancrede P, Barwicz J, Jutras S, Gruda I. The effect of surfactants on the aggregation state of amphotericin B. Biochim Biophys Acta. 1990;1030:289-95.

Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP, Torrado-Santiago S. Amphotericin B Formulations and Drug Targeting. J Pharm Sci. 2008;97:2405-2425.

Touitou E, Meidan VM, Horwitz E. Methods for quantitative determination of drug localized en the skin. J Control Release. 1998;56:7-21.

Tran QH, Duong S, Bertini P, Finlayson RJ. The treatment of complex regional pain syndrome type: a review of evidence. Can J Anaesth. 2010;57:149-66.

Trice JM, Pinals RS. Dimethyl sulfoxide: a review of its use in the reumatic disorders. *Semin Arthritis Rheum*. 1985;15:5-60.

Trottet L, Owen H, Holme P, Heylings J, Collin IP, Breen AP, *et al*. Are all acyclovir cream formulations bioequivalent? *Int J Pharm*. 2005;304:63-71.

Twist JN, Zats JL. Interaction of vehicles with model skin membranes en the permeation process. In: Bronaugh RL, Maibach HI, editors. *Percutaneous Absorption, Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1999. p. 229-233.

USP DI. Drug information for the health care professional. 20th Ed. USA: Micromedex. The United States Pharmacopeial Convention; 2000.

Valdespina S. Estudio Farmacéutico de Microesferas de Anfotericina B [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2007.

Vandermeulen G, Rouxhet L, Arien A, Brewster ME, Preat V. Encapsulation of Amphotericin B in poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone-cotrimethylenecarbonate) polymeric micelles. *Int J Pharm*. 2006;309:234-240.

Vázquez JA, Sobel JD, Demitriou R, Vaishampayan J, Lynch M, Zervos MJ. Karyotyping of *Candida albicans* isolates obtained longitudinally in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis*. 1994;170:1566-9.

Vázquez JA, Sobel JD. Fungal infections in diabetes. *Infect Dis Clin North Am*. 1995;9:97-116.

Vega-Sánchez DC, Bernal-López DC, Vilanueva-Recillas S, Arenas-Guzmán R. Infecciones urinarias por *Candida* spp. *Med Int Méx*. 2015;31:19-24.

Velegaki A, Cafarchia C, Gaitanis G, Iatta R, Boekhout T. *Malassezia* Infections in Humans and Animals: Pathophysiology, Detection, and Treatment. *PLoS Pathog* [Internet]. 2015 [cited 2015, September, 2];11(1):e1004523. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004523.

Vena GA, Chieco P, Posa F, Garofalo A, Bosco A, Cassano N. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. *New Microbiol.* 2012;35(2):207–13.

Vila-Jato JL. Formas de administración sobre la piel y las mucosas. *Tecnología Farmacéutica. Formas Farmacéuticas. Vol. II.* Madrid: Editorial Síntesis; 2001. p.305-343.

Villa LF. *Medimecum 2014. Guía de terapia farmacológica.* 19ª ed. Madrid: Adis International; 2014.

Vizmanos JR, Asensio R. *Curso y ejercicio de bioestadística.* Madrid: Autor Editor 3; 1976.

Volk WA, Benjamin DC, Kadner RJ, Pansons JT. *Microbiología Médica.* 3ª ed. Mexico: Mc Graw-Hill Interamericana; 2012.

Volmer AA, Szpilman AM, Carreira EM. Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives. *Nat prod rep.* 2010;27:1329-49.

Walter H, Rodrigo C, Laura F. Micosis superficiales. *Rev Med Clin Condes.* 2011;22(6):804–812.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harry DWS, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 1. Factors influencing distribution of Candida species in the oral cavity. *Aust Dent J.* 1998;43:45-50.

Weinstein A, Berman B. Topical treatment of common superficial tinea infections. *Am Fam Physician.* 2002;65:2095-102.

Wester RC, Chistoffel J, Hertway T, Poblete N, Maibach HI, Forsell J. Human cadáver skin viability for in vitro percutaneous absorption: storage and detrimental effect of heat- separation and freezing. *Pharm Res.* 1998;15(1):82-84.

Willhite CC, Katz PI. Toxicology updates: dimethyl sulfoxide. *J Appl Toxicol*. 1984;4:155–160.

Windholz M, Budavari S, Blumetti R, Otterbein E. Amphotericin B. *The Merck index*. New York: Merck; 1983.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004;39:309-317.

Yehia MA, El-Ammawi TS, Al-Mazidi KM, Abu El-Ela MA, Al-Ajmi HS. The spectrum of fungal infections with a special reference to dermatophytoses in the capital area of Kuwait 2000-2005: a retrospective analysis. *Mycopathologia*. 2010;169(4):241-246.

Yellowlees P, Greenfield C, McIntyre N. Dimethylsulphoxide-induced toxicity. *Lancet*. 1980;82(8202):1004-6.

Young B, Heath JW, Stevens A, Lowe JS, Wheather PR, Burkitt HG. *Wheater's functional histology; a text and colour atlas*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000.

Yu BG, Okano T, Kataoka K, Kwon G. Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B. *J Control Release*. 1998;53:131-6.

Zapata L. Epidemiología de las micosis superficiales. *Dermatología Peruana*. 2009;19(3):223-266.